Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Nauk o Zdrowiu

mgr Amira Podolak

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

Evaluation of the impact of mitochondrial DNA content in embryos on their developmental and implantation potential

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:
Prof. dr hab. n med. Krzysztof Łukaszuk

Zakład Pielęgniarstwa i Położnictwa Ginekologicznego
Katedra Pielęgniarstwa

Gdańsk 2022

Składam serdeczne podziękowania
Mojemu Promotorowi prof. dr hab. n. med. Krzysztofowi Łukaszukowi
Za zaangażowanie, okazane wsparcie oraz opiekę naukową.

Pracę tę dedykuję moim Rodzicom.

Spis treści

1. WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY 4
2. WYKAZ SKRÓTÓW 5
3. WSTĘP 6
4. CELE PRACY 8
5. MATERIAŁY I METODY 9
6. OMÓWIENIE PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY 11
7. WNIOSKI 20
8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM 22
9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM 25
10. BIBLIOGRAFIA 28
11. PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY 37
12. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW 37

1. Wykaz prac będących przedmiotem rozprawy

Prace poglądowe:

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. https://doi.org/10.3390/cells11050797

Autorzy korespondencyjni: Amira Podolak, Izabela Wocławek-Potocka

IF: 6.600; MNiSW: 140

Prace oryginalne:

Podolak, A.; Liss, J.; Kiewisz, J.; Pukszta, 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. https://doi.org/10.3390/cimb44010020

Autor korespondencyjny: Amira Podolak

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
*równorzędny wkład pracy autorów

Autor korespondencyjny: Amira Podolak

IF: 5.924, MNiSW: 140

Łącznie IF: 14.605, MNiSW: 350

2. Wykaz skrótów

ATP – adenozyno-5’-trifosforan (ang. Adenosine triphosphate)

AUGMENT - autologiczny transfer energii mitochondrialnej linii zarodkowej (ang. Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer)

DAPI - 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (ang. 4′,6-diamidino-2-phenylindole)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)

gDNA – genomowy DNA (ang. genomic DNA)

mtDNA – mitochondrialny DNA (ang. mitochondrial DNA)

nDNA – jądrowy DNA (ang. nuclear DNA)

E2 – estriadiol (ang. estradiol)

FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)

hCG – ludzka gonadotropina kosmówkowa (ang. human chorionic gonadotropin)

ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemników (ang. intracytoplasmic sperm injection)

IU – jednostka międzynarodowa (ang. international unit)

kbp – kilo par zasad (ang. kilo base pairs)

LH – hormon luteinizujący (ang. luteinising hormone)

mtDNA – mitochondrialny DNA (ang. mitochondrial DNA)

nDNA – jądrowy DNA (ang. nuclear DNA)

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji (ang. next-generation sequencing)

OC – doustna antykoncepcja (ang. oral contraception)

OSC – oogonalne komórki macierzyste (ang. oogonal stem cells)

PGT-A – genetyczna diagnostyka preimplantacyjna w kierunku aneuploidii (ang. preimplantation genetic testing for aneuploidies)

WGA – amplifikacja całego genomu (ang. whole genome amplification)

3. Wstęp

Mitochondria to niewielkie organella komórkowe, których główną rolą jest produkcja adenozynotrifosforanu (ATP - ang. adenosine triphosphate) będącego głównym źródłem energii komórkowej. Ponadto, biorą udział w regulacji szeregu procesów życiowych jak proliferacja, różnicowanie i apoptoza komórek, magazynowanie i uwalnianie jonów wapnia czy steroidogeneza [1–4]. Ich unikatową cechą jest posiadanie własnego genomu, dziedziczonego niezależnie od genomu jądrowego (nDNA - ang. nuclear DNA). Mitochondrialny DNA (mtDNA - ang. mitochondrial DNA) występuje w macierzy mitochondriów w kulistej formie i stanowi 16,6 kilo par zasad (kbp - ang. kilo base pairs). Posiada 37 genów, z których 13 koduje białka uczestniczące w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Pozostałe białka kodowane są przez DNA jądrowy i transportowane do wnętrza mitochondriów [5–7]. Uważa się, że jest ich około 1500 wymieniając między innymi czynniki transkrypcyjne, polimerazę γ (gamma) replikującą mtDNA czy enzymy niezbędne w cyklu kwasu cytrynowego [7].

U ludzi, jak u większości rozmnażających się płciowo gatunków, mitochondrialny DNA dziedziczony jest wyłącznie w linii matczynej [8]. Sposób eliminacji mitochondriów ojcowskich podczas zapłodnienia komórki jajowej nie został jednak dostatecznie poznany. Wśród potencjalnych przyczyn wymienia się między innymi mechanizmy tkankowo specyficzne czy poliubikwitynację mitochondriów plemników inicjującą ich degradację lizosomalną [9–15]. W rzadkich przypadkach dochodzi do tak zwanych przecieków ojcowskich skutkujących heteroplazmią czyli obecnością więcej niż jednego wariantu mtDNA [10,16–18]. Prawidłowo cała pula mtDNA pochodzi jednak od matki w związku z czym jego zawartość w komórce jajowej jest kluczowa dla rozwijającego się zarodka [19–21]. Również mechanizmy rozdzielania chromosomów oraz ich przesuwania poza komórkę podczas podziału mejotycznego są jednymi z najbardziej energochłonnych w oocytach wskazując na znaczącą funkcję mitochondriów w tym procesie [20,22]. W zapłodnionej komórce jajowej mitochondria dystrybuowane są asymetrycznie, prawdopodobnie celem skupienia mitochondriów do bezpośredniego i szybkiego dostarczania energii do jądra komórkowego. W innym wypadku, ze względu na duży rozmiar komórki jajowej transport ATP przez cytoplazmę mógłby być zbyt wolny dla rozwijającego się zarodka [23,24]. Dojrzały oocyt posiada ponad 200 000 kopii mtDNA, natomiast uważa się, że po zapłodnieniu komórki jajowej jego replikacja następuje dopiero na etapie blastocysty [22,25]. Zatem do tego etapu pula mtDNA w zarodkach musi być wystarczająca dla ich prawidłowego rozwoju. Fakt ten zwrócił uwagę wielu grup badawczych

sugerując zawartość mitochondrialnego DNA w zarodkach jako potencjalny marker ich selekcji w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego [26–45].

Wprowadzenie procedury zapłodnienia in vitro w 1978 roku zrewolucjonizowało leczenie niepłodności i w ciągu ponad 40 lat doprowadziło do urodzenia ponad 8 milionów dzieci [46]. Niemniej jednak proces ten wciąż pozostaje niewystarczająco skuteczny. Główną przyczyną niepowodzeń implantacji pozostają aberracje chromosomowe zarodków, jednak na skuteczność procesu wpływają również: jakość zarodka, receptywność endometrium, szeroko pojęte czynniki immunologiczne czy techniczne umiejętności zespołu dokonującego transferu [47,48]. Selekcja zarodków do transferu w dalszym ciągu opiera się o subiektywną ocenę morfologiczną dokonywaną przez embriologów. Wprowadzenie do praktyki klinicznej preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w kierunku aneuploidii (PGT-A - ang. preimplantation genetic testing for aneuploidies) umożliwiło wykluczanie z transferu zarodków niosących liczbowe zaburzenia chromosomowe [49–51]. Obecnie dzięki zastosowaniu sekwencjonowania następnej generacji (NGS - ang. next-generation sequencing) możliwa jest również względna analiza zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach polegająca na estymacji liczby odczytów mtDNA w porównaniu do nDNA. Korelacja liczby odczytów mitochondrialnego DNA z potencjałem implantacyjnym zarodków została po raz pierwszy stwierdzona w 2015 roku przez Fragouli i wsp [28]. Kolejno przeprowadzone badania dostarczyły jednak sprzecznych wniosków pozostawiając kwestię możliwości włączenia oceny poziomu zawartości mtDNA w zarodkach jako markera ich selekcji w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego bez jednoznacznej odpowiedzi [26–45]. Na przestrzeni lat doniesienia Fragouli zostały potwierdzone przez Ravichandran i wsp. (2017) [27], Du i wsp. (2021) [33], Wu i wsp. (2021) [52] oraz Wang i wsp. (2021) [32], jednak pozostałe zespoły badawcze zaprzeczyły istnieniu zależności poziomu mitochondrialnego DNA w zarodkach z ich potencjałem implantacyjnym [29,34,37–41].

4. Cele pracy

Celem niniejszej pracy była ewaluacja klinicznego znaczenia zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach w 3. oraz 5. lub 6. dobie po zapłodnieniu poprzez ocenę jej korelacji z ploidią oraz morfologią embrionów, ich potencjałem rozwojowym oraz implantacyjnym, a także wiekiem matki, aby ocenić możliwość wykorzystania parametru jako niezależnego markera selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego.

5. Materiały i metody

Przeprowadzone badania zostały zaakceptowane przez lokalną Komisję Bioetyczną.

Ewaluacji dokonano przeprowadzając ekstrapolację liczby odczytów dla mtDNA oraz nDNA z analiz preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w kierunku aneuploidii wszystkich chromosomów wykonanych w Laboratorium Genetycznym Medycznych Laboratoriów Diagnostycznych INVICTA dla pacjentów Klinik Leczenia Niepłodności INVICTA z wykorzystaniem zarodków transferowanych w cyklu świeżym (biopsja blastomeru w 3. dobie po zapłodnieniu) oraz mrożonym (biopsja trofoblastu w 5. lub 6. dobie po zapłodnieniu). Diagnostyka PGT-A wykonywana jest przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji (NGS – ang. Next Generation Sequencing) po uprzedniej amplifikacji całego genomu (WGA – ang. Whole Genome Amplification). Dzięki zastosowaniu tych metod możliwa jest ocena liczby odczytów w mtDNA oraz gDNA. Na podstawie powyższych parametr w możliwe jest wyliczenie współczynnika 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. Wykorzystane do tego zostały analizy statystyczne: test U Manna-Whitneya oraz test zgodności chi kwadrat w programie Statistica StatSoft Inc. Polska. Do analizy statystycznej 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 znamienną. Powyższe analizy przeprowadzono dla zarodków transferowanych zarówno w cyklach świeżych (biopsja blastomeru w 3. dobie po zapłodnieniu) jak i mrożonych (biopsja trofoblastu w 5. lub 6. dobie po zapłodnieniu) celem oceny znaczenia parametru na różnych etapach embriogenezy. 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. Dyskutując wyniki przeprowadzonych eksperymentów analizowano doniesienia pozostałych grup badających zagadnienie zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach. Ponadto, dokonano przeglądu dostępnej literatury dotyczącej roli mitochondriów i mitochondrialnego DNA w płodności człowieka i wczesnym

rozwoju zarodka ze szczególnym uwzględnieniem oceny możliwości wykorzystania analizy oraz modyfikacji mitochondrialnego DNA w praktyce klinicznej.

Wyniki poszczególnych etapów badań opublikowano w czasopismach medycznych (Current Issues in Molecular Biology, Cells, International Journal of Molecular Sciences) umieszczonych w wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, o zasięgu międzynarodowym.

6. Omówienie publikacji będących przedmiotem rozprawy

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. https://doi.org/10.3390/cells11050797

W niniejszej pracy poglądowej dokonano prezentacji roli mitochondriów w zachowaniu płodności człowieka oraz wczesnej embriogenezie wraz z analizą możliwości wykorzystania oceny oraz modyfikacji mitochondrialnego DNA w praktyce klinicznej. Opisano podstawowe mechanizmy biologiczne związane z funkcjonowaniem mitochondriów, jak również zależności między utrzymaniem aktywności tych organelli a prawidłowym funkcjonowaniem ludzkich gamet oraz rozwojem zarodka uwzględniając czynniki warunkujące rozwój niewydolności mitochondriów.

Znaczenie mitochondriów w zachowaniu płodności przejawia się w wielu aspektach. Odpowiednia ilość tych organelli w komórkach jajowych warunkuje prawidłowy dalszy rozwój zarodka [20,25,53]. Nie należy jednak interpretować aktywności mitochondriów wyłącznie pod kątem liczby kopii mitochondrialnego DNA, ponieważ jest ona ściśle regulowana również przez DNA jądrowy, wewnątrzkomórkowe stężenia jonów oraz dostępność substratów [3,7,53–55]. Dowiedziono na przykład, iż zarodkowa odpowiedź metaboliczna może różnić się w zależności od składu medium hodowlanego zastosowanego w procedurze in vitro [56]. Wydolność tych organelli jest również kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania gamet męskich. Ruchliwość plemników jest całkowicie zależna od funkcjonalności szlaków fosforylacji oksydacyjnej. Wykazano również związek występowania mutacji w mitochondrialnym DNA z zaburzeniami jakości nasienia pod postacią astenozoospermii oraz oligoastenozoospermii [14,57–60]. Poza mutacjami, na pogorszenie funkcjonalności mitochondriów wpływa również stres oksydacyjny związany z zaburzoną homeostazą wapniową, naturalnym starzeniem organizmu czy otyłością [61–66].

W dalszej części pracy przeanalizowano dostępne dane literaturowe dotyczące zarówno oceny jak i modyfikacji mitochondrialnego DNA w procedurze wspomaganego rozrodu. Na przestrzeni ostatnich lat wiele grup badawczych ewaluowało wpływ zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich potencjał rozwojowy i implantacyjny [26–45]. W niniejszej pracy dokonano prezentacji wyników przeprowadzonych eksperymentów z uwzględnieniem liczebności prób badanych, etapu rozwojowego zarodka podczas prowadzenia

badań oraz technicznych aspektów oceny liczby kopii mtDNA. Wykazano znaczną rozbieżność między wynikami uzyskanymi pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi wynikającą z braku standaryzacji badań nad klinicznym znaczeniem zawartości mtDNA. Zidentyfikowano kilka przyczyn zaobserwowanych rozbieżności obejmujących zarówno zastosowaną formułę obliczeniową jak i technikę WGA, protokoły i odczynniki stosowane podczas prowadzenia hodowli i przechowywania zarodków czy liczebność grupy badanej w przeprowadzonych eksperymentach. Stwierdzono zatem konieczność przeprowadzenia większego, najlepiej wieloośrodkowego badania celem ostatecznej weryfikacji użyteczności parametru w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego. Ponadto, przedstawiono dotychczasowe osiągnięcia w aspekcie edycji mitochondrialnego genomu [67–70]. Mimo iż zagadnienie cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród naukowców wprowadzenie takich technik do praktyki klinicznej wydaje się jednak odległe. Obecnie wystąpienia chorób mitochondrialnych u potomstwa można uniknąć dzięki zastosowaniu transferu matczynego wrzeciona kariokinetycznego lub transferu przedjądrzy do komórek jajowych dawczyń [71–74]. Natomiast w kwestii poprawy potencjału reprodukcyjnego oocytów zaprezentowano dwie - wycofane już z praktyki klinicznej - techniki, mitochondrialną terapię zastępczą oraz autologiczny transfer energii mitochondrialnej linii zarodkowej (AUGMENT - ang. Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer) [75–79]. Pierwsza z technik mimo wykazywanej skuteczności klinicznej została zakazana przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA - ang. US Food and Drug Administration) powołując się na kwestie etyczne oraz bezpieczeństwo genetyczne ze względu na wykorzystanie materiału biologicznego od strony trzeciej [80]. AUGMENT, terapia firmy OvaScience oparta o autologiczny transfer oogonalnych komórek macierzystych (OSC - ang. oogonal stem cells) wyizolowanych z biopsji korowych została natomiast okrzyknięta metodą opartą o niewystarczające naukowe dowody jej skuteczności doprowadzając ostatecznie firmę do bankructwa [81–86].

Podsumowując, pomimo ogromnego potencjału zastosowań klinicznych, dziedzina badań mitochondrialnych w dalszym ciągu nie jest dobrze ugruntowana. W celu pełnej ewaluacji klinicznej przydatności oceny oraz modyfikacji ilości oraz funkcjonalności mitochondrialnego DNA niezbędne jest prowadzenie dalszych eksperymentów.

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. https://doi.org/10.3390/cimb44010020

Niniejsze badanie przeprowadzono wykonując ekstrapolację liczby odczytów mitochondrialnego i jądrowego DNA z analiz preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w kierunku aneuploidii wszystkich chromosomów dokonanych na biopsjach blastomeru 314 zarodków 6-8 komórkowych pochodzących od 69 par leczonych w Klinikach Leczenia Niepłodności INVICTA w latach 2013 - 2015. Kryteria włączenia pacjentów do badania obejmowały: (1) wskazania do wykonania PGT-A - kobiety w wieku reprodukcyjnym po 2 lub więcej poronieniach lub niepowodzeniach implantacji zarodka, wiek kobiety powyżej 35. roku życia, wiek mężczyzny powyżej 50. roku życia, (2) transfer zarodka wyłącznie w cyklu świeżym, (3) pacjentki o znanym wyniku przeprowadzonego transferu, tj. do czasu potwierdzenia ciąży klinicznej lub poronienia. Z badania wyłączono pacjentki o stwierdzonych schorzeniach wewnątrzmacicznych.

W ramach przygotowania do procedury zapłodnienia pozaustrojowego pacjentki były poddane stymulacji hormonalnej. Pobranie oocytów przeprowadzono 34-36 godzin po podaniu 5000 IU hCG (Choragon, Ferring). ICSI wykonano 4-7 godzin po pobraniu komórek jajowych, natomiast 18 godzin po wykonaniu ICSI (ang. intracytoplasmic sperm injection) oceniono je pod kątem zapłodnienia. Hodowlę embrionów prowadzono z zastosowaniem medium sekwencyjnego G (Vitrolife) w atmosferze o niskiej prężności tlenu (ok. 5%). Oceny morfologicznej zarodków dokonano według skali Cumminsa. Biopsję blastomeru wykonano 3 dni po zapłodnieniu komórki jajowej na etapie 6-8 komórkowego zarodka. Następnie zarodki przemywano, transferowano do medium G2 (Viatrolife) i hodowlę prowadzono przez dwa kolejne dni, przeprowadzając ich transfer w 5. dniu tego samego cyklu.

Lizę zarodków i amplifikację całego genomu wykonano wykorzystując PicoPLEX Single Cell WGA Kit (New England BioLabs Inc.) zgodnie z protokołem producenta. Po zakończeniu WGA zmierzono stężenia badanych próbek metodą fluorymetryczną przy użyciu Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) na urządzeniu Qubit 2.0. Biblioteki przygotowano z wykorzystaniem Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Ion Torrent) zgodnie z instrukcją producenta. Przed poddaniu amplifikacji klonalnej próbki rozcieńczano do 24 pikomoli, barkodowano z użyciem Ion Xpress Barcode Adapters kits (Ion Torrent), a następnie pulowano. Amplifikację klonalną przeprowadzono używając zestawu Ion PGM™ Template OT2 200 Kit

(Ion Torrent) i platformy Ion One Touch 2 System. Sekwencjonowanie następnej generacji wykonano na chipach 314 lub 316, na urządzeniu Personal Genome Machine (PGM) z zastosowaniem Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 (Ion Torrent).

Analizy liczby odczytów mtDNA i nDNA dokonano przy użyciu funkcji Coverage Analysis (V. 5.12.0.0) na serwerze Torrent Suite V. 5.12.3 (Life Technologies). Odczytaną wartość dla mtDNA dzielono przez liczbę odczytów nDNA po jej uprzedniej korekcji w przypadku obecności aneuploidii. Dla ułatwienia estymacji otrzymane wyniki mnożono przez 1000. Następnie uzyskane wartości porównywano w grupach: (1) zarodki euploidalne i aneuploidalne, (2) zarodki o dobrej i złej morfologii w skali Cumminsa, (3) zarodki ze skuteczną implantacją i z niepowodzeniem implantacji, (4) zarodki o genetycznej płci żeńskiej i męskiej, (5) zarodki od matek do 37. roku życia i starszych. Z uwagi, iż otrzymany rozkład nie był normalny analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Wartość p poniżej 0.05 uznawano za statystycznie znamienną.

Ponadto, wykonano znakowanie fluorescencyjne wybranych oocytów i zarodków. Mitochondria wyznakowano MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen), natomiast jądra komórkowe Hoechst 33342 (Invitrogen) celem oceny dystrybucji mitochondriów w komórkach.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono zależność zawartości 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). Niniejsze badanie nie pozwala na wyjaśnienie przyczyn takiego zjawiska, ale prawdopodobnie może wskazywać to na wyższe zapotrzebowanie energetyczne zarodków aneuploidalnych z uwagi na inicjowanie mechanizmów naprawczych. Niewiele z dotychczas przeprowadzonych badań z zakresu oceny znaczenia zawartości mtDNA w embrionach przeprowadzono na etapie zarodka 3-dniowego, jednak uzyskane wyniki są zgodne z wynikami większości zespołów badających blastocysty [26,27,29,32,33,35,37,39,43,47]. Zależność ta wskazuje na możliwość wykorzystania parametru jako dodatkowego markera selekcji embrionów. Niemniej jednak, wykonane znakowanie fluorescencyjne potwierdziło asymetryczną dystrybucję mitochondriów wśród blastomerów zarodka co wskazuje na potencjalnie dużą zmienność otrzymywanych wyników zależnie od pobranego blastomeru. Potwierdza to również fakt uzyskania wysoce różniących się wyników oznaczeń mtDNA pomiędzy zarodkami uzyskanymi od tych samych pacjentek. Ponadto, wyniki PGT-A dostarczają bardziej jednoznacznych i pewnych wyników w zakresie oceny aneuploidii embrionów. Biorąc pod uwagę wymienione argumenty przydatność kliniczna badanego parametru, zwłaszcza na etapie zarodka komórkowego, wydaje się mało

prawdopodobna. W przypadku pozostałych zmiennych nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic pomiędzy zawartością mtDNA w analizowanych grupach. Nie wykazano korelacji parametru z potencjałem implantacyjnym (p 0.18), morfologią (p 0.09), płcią (p 0.16) zarodków ani wiekiem matki (p 0.14). Jak wspomniano, niewiele grup badawczych prowadziło eksperymenty z wykorzystaniem biopsji blastomeru. Fragouli i wsp. [28] stwierdzili związek zawartości mtDNA z potencjałem implantacyjnym zarodka zarówno na etapie zarodka 3-dniowego jak i blastocysty, natomiast przeprowadzone przez nich badanie wydaje się mało wiarygodne. W swojej pracy wskazali również na korelację parametru z wiekiem matki, jednak w przypadku badania blastomerów z zarodków 3 dniowych stwierdzili wyższe zawartości mtDNA w zarodkach pochodzących od młodszych matek, natomiast badając komórki z blastocyst uzyskali wzrost zawartości mtDNA w zarodkach wraz z wiekiem matki. Tego typu zależność wydaje się mało prawdopodobna. Ponadto, weryfikując ustalone progi wartości mtDNA w badaniu z 2017 roku ogłosili zgodność otrzymanych wyników z pierwszymi doniesieniami, jednak w przypadku różnic pomiędzy poziomem mtDNA w zarodkach, a wiekiem matki otrzymane wyniki okazały się statystycznie nieznamienne [26].

Głównym ograniczeniem niniejszego badania jest preferencyjna amplifikacja dwóch regionów mtDNA (od pozycji 65 do 500 oraz od 9950 do 10270). Ze względu na stały i powtarzalny charakter tego efektu nie uniemożliwia to wiarygodnej analizy mtDNA na potrzeby eksperymentu, jednak nie zapewnia wystarczającej wiarygodności dla bardziej szczegółowej analizy sekwencji mtDNA. Ponadto, nie przeprowadzono ewaluacji patogennych mutacji mtDNA, które również mogły mieć wpływ na wyniki uzyskiwane w niniejszym eksperymencie. Należy jednak podkreślić, że zastosowana metoda nie służy jakościowej ocenie DNA. Technika PGT-A została zaprojektowana z myślą o ilościowej ocenie chromosomów w sposób możliwie szybki i przystępny cenowo. Również ewentualna heteroplazmia nie była brana pod uwagę podczas analizy otrzymanych wyników, gdyż wymagałoby to zastosowania tak zwanego głębokiego sekwencjonowania oraz prawdopodobnie zmiany techniki WGA.

Podsumowując, pomimo stwierdzenia zależności pomiędzy zawartością mtDNA w zarodkach a ich statusem chromosomowym wykorzystanie parametru w praktyce klinicznej jako niezależnego markera selekcji embrionów w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego wydaje się mało prawdopodobna z uwagi na brak powiązań z potencjałem implantacyjnym zarodków. Sama ocena ploidalności zarodków daje w naszych badaniach wynik jednoznaczny i względna ocena ilościowa mtDNA nie daje żadnych dodatkowych korzyści. Ocena mtDNA nie pomaga również w selekcji optymalnego euploidalnego zarodka do transferu.

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

Niniejsze badanie przeprowadzono wykonując ekstrapolację liczby odczytów mitochondrialnego i jądrowego DNA z analiz preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w kierunku aneuploidii wszystkich chromosomów dokonanych na biopsjach trofektodermy 716 zarodków na etapie rozwojowym blastocysty pochodzących od 275 par leczonych w Klinikach Leczenia Niepłodności INVICTA w latach 2014 - 2015. Podane ramy czasowe wybrano celem uniknięcia wpływu zmian protokołów laboratoryjnych czy personalnych w Laboratorium Genetycznym na porównanie z wynikami poprzedniego badania. Kryteria włączenia pacjentów do badania obejmowały: (1) wskazania do wykonania PGT-A - kobiety w wieku reprodukcyjnym po 2 lub więcej poronieniach lub niepowodzeniach implantacji zarodka, wiek kobiety powyżej 35. roku życia, wiek mężczyzny powyżej 50. roku życia, poważny czynnik męski lub obawa przed wystąpieniem aneuploidii u potomstwa (2) biopsja zarodka na etapie blastocysty, (3) pacjentki o znanym wyniku przeprowadzonego transferu, tj. do czasu potwierdzenia ciąży klinicznej lub poronienia. Z badania wyłączono pacjentki o stwierdzonych schorzeniach wewnątrzmacicznych.

W ramach przygotowania do procedury zapłodnienia pozaustrojowego pacjentki były poddane stymulacji hormonalnej. Wszystkie kobiety leczono długim protokołem z agonistą rozpoczynając od doustnych środków antykoncepcyjnych (OC) (Ovulastan, Adamed) od 2-5 dnia cyklu. Octan triptoreliny 0,1 mg (Gonapeptyl, Ferring) podano 14 dni po rozpoczęciu OC. Czternaście dni później (siedem dni po zakończeniu podawania OC) podano gonadotropiny (Menopur, Ferring) w celu stymulacji jajników. Podawana dawka była zależna od poziomu AMH i wahała się od 150 do 300 IU dziennie (12). Wzrost pęcherzyków monitorowano w 8 dniu stymulacji za pomocą ultrasonografii przezpochwowej i testów oceniających poziomy estradiolu (E2), progesteronu (P) i hormonu luteinizującego (LH) w surowicy. Pobranie oocytów przeprowadzono 36 h po podaniu 5000 IU hCG (Choragon, Ferring, Saint-Prex, Szwajcaria).

Hodowlę wszystkich ocenianych zarodków prowadzono na podłożu sekwencyjnym G1 i G2 (Vitrolife) do etapu blastocysty w 6% CO2 i 5% O2 w 37C. Oceny morfologicznej zarodków dokonywano w 5. dobie według skali oceny Konsensusu w Stambule. Biopsji dokonywano na zarodkach o ocenie od B211. Dla wolniej rozwijających się embrionów

hodowlę prowadzono dalej, do dnia 6. lub 7., kiedy osiągały wymieniony stopień rozwojowy. Podczas biopsji pobierano około 5 - 7 komórek trofektodermy. Pobrane komórki przemywano, poddawano witryfikacji (Kitazato) i przechowywano w ciekłym azocie.

Lizę pobranych komórektrofoektodermy i amplifikację całego genomu wykonano wykorzystując PicoPLEX Single Cell WGA Kit (New England BioLabs Inc.) zgodnie z protokołem producenta. Po zakończeniu WGA zmierzono stężenia badanych próbek metodą fluorymetryczną przy użyciu Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) na urządzeniu Qubit 2.0. Biblioteki przygotowano z wykorzystaniem Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Ion Torrent) zgodnie z instrukcją producenta. Przed poddaniu amplifikacji klonalnej próbki rozcieńczano do 24 pikomoli, barkodowano z użyciem Ion Xpress Barcode Adapters kits (Ion Torrent), a następnie pulowano. Amplifikację klonalną przeprowadzono używając zestawu Ion PGM™ Template OT2 200 Kit (Ion Torrent) i platformy Ion One Touch 2 System. Sekwencjonowanie następnej generacji wykonano na chipach 316, na urządzeniu Personal Genome Machine (PGM) z zastosowaniem Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 (Ion Torrent).

Jak w poprzednim badaniu, analizy liczby odczytów mtDNA i nDNA dokonano przy użyciu funkcji Coverage Analysis (V. 5.12.0.0) na serwerze Torrent Suite V. 5.12.3 (Life Technologies). Odczytaną wartość dla mtDNA dzielono przez liczbę odczytów nDNA po jej uprzedniej korekcji w przypadku obecności aneuploidii. Dla ułatwienia estymacji otrzymane wyniki mnożono przez 1000. Następnie uzyskane wartości porównywano w grupach: (1) zarodki euploidalne i aneuploidalne, (2) zarodki ze skuteczną implantacją i z niepowodzeniem implantacji, (3) zarodki o dobrej i złej morfologii w skali oceny według Konsensusu w Stambule dotyczącego oceny zarodków, (4) zarodki poddane biopsji w 5. i 6. dobie po zapłodnieniu, (5) zarodki o genetycznej płci żeńskiej i męskiej, (6) zarodki od matek do 37. roku życia i starszych. Z uwagi, iż otrzymany rozkład nie był normalny analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testów U Manna-Whitneya oraz chi-kwadrat. Wartość p poniżej 0.05 uznawano za statystycznie znamienną.

Ponadto, wykonano znakowanie fluorescencyjne wybranych oocytów i zarodków. Mitochondria wyznakowano MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen), natomiast jądra komórkowe DAPI (Invitrogen) celem oceny dystrybucji mitochondriów w komórkach.

Jak w poprzednim badaniu, stwierdzono statystycznie znamienną zależność pomiędzy zawartością mitochondrialnego DNA a ploidią zarodków (średnia wartość mtDNA w zarodkach euploidalnych 1.13 ± 1.37, średnia wartość w zarodkach aneuploidalnych 1.45 ± 1.78, p 0.02). Ponadto, zaobserwowano korelację zawartości mitochondrialnego DNA z dniem biopsji zarówno dla wszystkich analizowanych zarodków (średnia wartość mtDNA w

zarodkach poddanych biopsji w 5. dobie 1.41 ± 1.66, średnia wartość mtDNA w zarodkach poddanych biopsji w 6. dobie 1.19 ± 1.27, p 0.001), zarodków euploidalnych (1.21 ± 1.03, 0.98 ± 0.86, p 0.002) oraz zarodków o potwierdzonej skutecznej implantacji (1.27 ± 0.93, 0.84 ± 0.71, p 0.03). Nasze wyniki są zgodne z obserwacjami innych zespołów badawczych [32,39,41,52]. Pomimo iż związek morfologii i tempa rozwoju blastocysty ze statusem chromosomowym zarodka w dalszym ciągu nie został ustalony, przeprowadzone badania wskazują na wyższy wskaźnik implantacji blastocyst z 5. doby [87–90]. W związku z tym wyższa zawartość mtDNA może być związana z potencjałem rozwojowym zarodka. Niemniej jednak, przeprowadzona analiza nie wykazała zależności statystycznie znamiennej pomiędzy zawartością mtDNA a potencjałem implantacyjnym zarodków (p 0.39). Wyniki te są zgodne z wynikami wcześniejszego eksperymentu z wykorzystaniem biopsji blastomerów. Wyniki dotychczas przeprowadzonych eksperymentów pozostają w tej kwestii bardzo rozbieżne. Większość zespół badawczych wykazała brak związku pomiędzy wymienionymi parametrami [29,34,37–42], jednak niektóre grupy zaobserwowały ujemną korelację [27,28,32,33,91] oraz wedle naszej wiedzy jedna praca wskazuje na korelację dodatnią pomiędzy zawartością mtDNA a potencjałem implantacyjnym zarodka [52]. Należy zwrócić uwagę na brak jednorodności w analizach zawartości mitochondrialnego DNA. W dotychczas opublikowanych pracach zidentyfikowano kilka wzorów obliczeniowych. Ponadto, nawet zespoły stosujące te same formuły uzyskiwały rozbieżne wyniki. Dla przykładu, w badaniu Shang i wsp. [34] nie zaobserwowano korelacji pomiędzy wymienionymi parametrami, podczas gdy Du i wsp. [33] korzystając z tego samego sposobu obliczeń wykazał zależność statystycznie znamienną. W związku z tym, źródeł rozbieżności należy również poszukiwać w podejściu technicznym do wykonania PGT-A. Jedną z potencjalnych przyczyn może być zastosowany protokół WGA ze względu na możliwe różnice w skuteczności amplifikacji DNA mitochondrialnego i genomowego. Dodatkowo warto zwrócić uwagę na badanie Wang i wsp. [32], którzy mimo stwierdzenia korelacji zawartości mtDNA z potencjałem implantacyjnym zarodka, po dokonaniu oceny jakości klasyfikatora wykazali niską wartość predykcyjną parametru jako markera selekcji embrionów. W przypadku pozostałych zmiennych, tak jak w przypadku wcześniejszego eksperymentu, nie wykazano statystycznie znamiennych różnic pomiędzy wartościami mtDNA w analizowanych grupach. Nie wykazano korelacji zawartości mtDNA z morfologią zarodków (p 0.12), płcią genetyczną zarodków (p 0.99) czy wiekiem matki (p 0.43).

Jak w przypadku poprzedniego eksperymentu ograniczeniami niniejszego badania są preferencyjna amplifikacja dwóch regionów mtDNA, brak ewaluacji patogennych mutacji

mtDNA oraz ewentualnej heteroplazmii. Jak wcześniej, wymienione ograniczenia nie wpłynęły jednak na możliwość wiarygodnej oceny zależności zawartości mtDNA z potencjałem rozwojowym i implantacyjnym zarodków.

Podsumowując, wykazano statystycznie znamienną zależność pomiędzy zawartością mtDNA a ploidalnością embrionów oraz dniem biopsji wskazując na możliwy związek parametru z potencjałem rozwojowym zarodków. Niemniej jednak, nie zaobserwowano 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.

7. Wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich potencjał rozwojowy i implantacyjny, na etapie zarodka 3-dniowego oraz blastocysty, oraz weryfikację użyteczności wymienionego markera w praktyce klinicznej jako narzędzia selekcji embrionów w procedurze zapłodnienia in vitro.

Przeprowadzone badania dowiodły poniższych wniosków:

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. Niniejsze badanie nie pozwala jednak na wyjaśnienie przyczyn takiego zjawiska. Przypuszczalnie może wskazywać to na wyższe zapotrzebowanie energetyczne zarodków aneuploidalnych z uwagi na inicjowanie mechanizmów naprawczych. Konieczne jest prowadzenie dalszych badań celem poznania podłoża biologicznego zaobserwowanej zależności.
2. Biorąc pod uwagę przeprowadzone dotychczas badania wykazujące 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. Brak statystycznie znamiennej zależności pomiędzy zawartością mtDNA w zarodkach a ich potencjałem implantacyjnym wskazuje na niską przydatność markera jako dodatkowego, niezależnego narzędzia selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego. Wykazanie powyższych zależności nie jest wystarczające do wprowadzenia markera do praktyki klinicznej, ponieważ badania PGT-A dostarczają bardziej jednoznacznych i wiarygodnych wyników statusu chromosomowego embrionów.
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. Potwierdza to również fakt uzyskania wysoce różniących się wyników oznaczeń mtDNA pomiędzy zarodkami uzyskanymi od tych samych pacjentek. Również na etapie

blastocysty znakowanie fluorescencyjne wykazało zmienność rozmieszczenia mitochondriów pomiędzy zarodkami. Konieczne jest prowadzenie dalszych badań celem poznania przyczyn tego zjawiska oraz mechanizmów biologicznych, które nim sterują.

6. Zidentyfikowane w literaturze naukowej rozbieżności w uzyskiwanych wynikach analiz dotyczących klinicznego znaczenia zawartości mtDNA w zarodkach wynikają z braku standaryzacji badań. Prawdopodobnie wpływ na uzyskiwane wyniki mają: formuła obliczeniowa, technika WGA, dzień biopsji zarodków (na etapie rozwojowym blastocysty), protokoły oraz odczynniki stosowane podczas prowadzenia hodowli oraz przechowywania zarodków, a także liczebność grupy badanej w eksperymencie.

8. Streszczenie w języku polskim

Wprowadzenie zapłodnienia pozaustrojowego zrewolucjonizowało oblicze medycyny. Niemniej jednak, po ponad 40 latach, proces ten nadal pozostaje niewystarczająco wydajny. Aberracje chromosomowe zarodków uważane są za główną przyczynę niepowodzeń implantacji, jednak na skuteczność procesu wpływają również: jakość zarodka, receptywność endometrium, szeroko pojęte czynniki immunologiczne czy techniczne umiejętności zespołu dokonującego stymulacji pęcherzyków jajnikowych, pobrania komórek jajowych, całego procesu obróbki embriologicznej i hodowli oraz transferu zarodków. Selekcja zarodków do transferu w dalszym ciągu opiera się o subiektywną ocenę morfologiczną dokonywaną przez embriologów. Wprowadzenie do praktyki klinicznej preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w kierunku aneuploidii umożliwiło wykluczanie z transferu zarodków niosących zaburzenia chromosomowe. Obecnie dzięki zastosowaniu sekwencjonowania następnej generacji możliwa jest również względna analiza zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach polegająca na estymacji liczby odczytów mitochondrialnego DNA w porównaniu do DNA genomowego. Zagadnienie wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich potencjał rozwojowy i implantacyjny zwróciło uwagę naukowców ze względu na kluczową rolę mitochondriów w szeregu procesów życiowych. Ponadto, należy podkreślić, iż wedle obecnej wiedzy, uważa się że po zapłodnieniu komórki jajowej replikacja następuje dopiero na etapie blastocysty. Zatem do tego etapu pula mitochondrialnego DNA w zarodkach musi być wystarczająca dla ich prawidłowego rozwoju.

Zależność poziomu zawartości mitochondrialnego DNA z potencjałem implantacyjnym zarodków została po raz pierwszy stwierdzona z użyciem sekwencjonowania następnej generacji w 2015 roku przez Fragouli i wsp. i natychmiast skomercjalizowana. Eksperymenty przeprowadzone przez inne zespoły badawcze dostarczyły jednak w ostatnich latach sprzecznych wniosków pozostawiając kwestię możliwości włączenia oceny poziomu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach jako markera ich selekcji w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego bez jednoznacznej odpowiedzi.

Niniejsze badanie przeprowadzono celem ewaluacji wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach w 3. oraz 5. lub 6. dobie po zapłodnieniu na potencjał rozwojowy i implantacyjny embrionów, aby ocenić możliwość wykorzystania

parametru jako niezależnego markera selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego.

Ewaluacji dokonano przeprowadzając ekstrapolację liczby odczytów dla mitochondrialnego DNA oraz DNA genomowego z analiz preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w kierunku aneuploidii wszystkich chromosomów wykonanych w Laboratorium Genetycznym Medycznych Laboratoriów Diagnostycznych INVICTA dla pacjentów Klinik Leczenia Niepłodności INVICTA z wykorzystaniem zarodków transferowanych w cyklu świeżym (biopsja blastomeru w 3. dobie po zapłodnieniu) oraz mrożonym (biopsja trofoblastu w 5. lub 6. dobie po zapłodnieniu). Preimplantacyjna diagnostyka genetyczna w kierunku aneuploidii wykonywana była przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji po uprzedniej amplifikacji całego genomu. Zastosowaniu tych metod umożliwiło ocenę liczby odczytów w mitochondrialnym oraz genomowym DNA. Na podstawie powyższych parametrów wyliczono współczynnik określany w literaturze jako tzw. „mitochondrial score". Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej celem oceny korelacji uzyskanych wyników z ploidią, morfologią, płcią i potencjałem implantacyjnym zarodków oraz dniem biopsji w przypadku blastocyst, a także z wiekiem matki. Ponadto, dokonano przeglądu dostępnej literatury dotyczącej roli mitochondriów i mitochondrialnego DNA w płodności człowieka i wczesnym rozwoju zarodka ze szczególnym uwzględnieniem oceny możliwości wykorzystania analizy oraz modyfikacji mitochondrialnego DNA w praktyce klinicznej.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono statystycznie znamienną zależność zawartości mitochondrialnego DNA z ploidią embrionów zarówno na etapie zarodka 3-dniowego jak i 5- lub 6-dniowego oraz z dniem biopsji na etapie blastocysty. Powyższe wyniki wskazują na związek badanego parametru z potencjałem rozwojowym zarodków. Niemniej jednak wyniki analiz preimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w kierunku aneuploidii dostarczają bardziej jednoznacznych i wiarygodnych wyników statusu chromosomowego zarodków. Nie wykazano natomiast korelacji markera z potencjałem implantacyjnym zarodków, jak również ich morfologią, płcią czy wiekiem matki. Brak statystycznie znamiennej zależności pomiędzy zawartością mitochondrialnego DNA a potencjałem implantacyjnym zarodków wskazuje na niską przydatność parametru jako dodatkowego, niezależnego narzędzia selekcji zarodków do zapłodnienia in vitro. Ponadto, na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury zidentyfikowano brak standaryzacji badań

mitochondrialnego DNA jako przyczynę rozbieżności wyników uzyskiwanych pomiędzy różnymi zespołami badawczymi. Prawdopodobnie wpływ na uzyskiwane wyniki mają formuła obliczeniowa, technika amplifikacji całego genom, dzień biopsji zarodków (na etapie rozwojowym blastocysty), protokoły oraz odczynniki stosowane podczas prowadzenia hodowli oraz przechowywania zarodków, a także liczebność grupy badanej w eksperymencie.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują na związek zawartości mitochondrialnego DNA z potencjałem rozwojowym embrionów. Konieczne jest prowadzenie dalszych eksperymentów celem poznania biologicznego podłoża zaobserwowanych zależności. Niemniej jednak badany parametr wydaje się wykazywać niską użytecznością jako niezależny marker selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego.

Słowa kluczowe: aneuploidia, zarodek, selekcja zarodków, transfer zarodków, embriogeneza, potencjał implantacyjny, mitochondria, mitochondrialny DNA (mtDNA), mitochondrial score (Ms), zapłodnienie in vitro, preimplantacyjna diagnostyka genetyczna w kierunku aneuploidii (PGT-A).

9. Streszczenie w języku angielskim

The introduction of in vitro fertilisation has revolutionised the face of medicine. Nevertheless, after more than 40 years, the process remains inefficient. Embryo chromosomal aberrations are considered to be the main cause of implantation failures, however, the effectiveness of the process is also influenced by the quality of the embryo, endometrial receptivity, broadly understood immunological factors, and the technical skills of the team including stimulation of the ovarian follicles, the collection of oocytes, the entire process of embryological processing, embryo culture and transfer. The selection of embryos for transfer is still based on subjective morphological assessment. Introduction of preimplantation genetic testing for aneuploidy into clinical practice made it possible to exclude embryos carrying chromosomal abnormalities from the transfer. Currently, due to the use of Next - Generation Sequencing, it is also possible to perform a relative quantification of the mitochondrial DNA content in the embryos by estimating the number of mitochondrial DNA reads compared to genomic DNA reads. Scientists have focused on the possible influence of mitochondrial DNA content in embryos on their developmental and implantation potential due to the key role of mitochondria in a number of life processes. Moreover, it should be highlighted that, according to current knowledge, it is believed that after fertilisation of the ovum, replication does not occur until the stage of the blastocyst. Thus, by this stage the mitochondrial DNA content in the embryos must be sufficient for their normal development.

The relationship between the level of mitochondrial DNA content and the embryos implantation potential was first confirmed with the use of Next-Generation Sequencing in 2015 by Fragouli et al. Then, the biomarker was immediately commercialised, however, experiments carried out in recent years by other research teams have provided divergent conclusions. In consequence, the question of the possibility of including the assessment of the level of mitochondrial DNA content in embryos as a marker of their selection in the procedure of in vitro fertilisation remains unanswered.

This study was conducted to evaluate the impact of the mitochondrial DNA content in embryos on the 3rd and 5th or 6th day after fertilisation on their developmental and implantation potential in order to assess the possibility of using the

parameter as an independent marker of embryo selection in the in vitro fertilisation procedure.

The evaluation was made by extrapolating the number of reads of mitochondrial DNA and genomic DNA from preimplantation genetic testing for aneuploidies performed in the Genetic Laboratory of INVICTA Medical Laboratories for patients of the INVICTA Infertility Clinics with the use of embryos transferred in the fresh cycle (blastomere biopsy on the 3rd after fertilisation) and frozen cycle (trophoblast biopsy on the 5th or 6th day after fertilisation). Preimplantation genetic testing for aneuploidy was performed using Next - Generation Sequencing after prior Whole Genome Amplification. Usage of these methods allowed the assessment of the number of reads of mitochondrial and genomic DNA. Based on the above-mentioned parameters, the ratio was calculated. In the literature it is referred to as "mitochondrial score". The obtained results were subjected to statistical analysis in order to assess the correlation of the obtained results with the ploidy, morphology, genetic sex, and implantation potential of the embryos, and the day of biopsy in the case of blastocysts, as well as with the age of the mother. In addition, the available literature on the role of mitochondria and mitochondrial DNA in human fertility and early embryonic development was reviewed, with the emphasis on the assessment of the possibility of using the analysis and modification of mitochondrial DNA in clinical practice.

On the basis of the performed experiments, a statistically significant correlation was found between the content of mitochondrial DNA and the ploidy of embryos both at the stage of a 3-day and 5- or 6-day embryo, and on the day of biopsy at the blastocyst stage of development. The above results indicate the relationship of the examined parameter with the developmental potential of embryos. Nevertheless, the results of preimplantation genetic testing for aneuploidy provide more reliable results of the embryos' chromosomal status. Furthermore, no correlation of the marker with the implantation potential of the embryos, as well as their morphology, sex or maternal age was found. The lack of a statistically significant relationship between the mitochondrial DNA content and the embryos implantation potential indicates the low usefulness of the parameter as an additional, independent tool for selecting embryos for in vitro fertilisation. Moreover, on the basis of the conducted literature review, the lack of standardisation of mitochondrial DNA analysis was identified as the reason for the divergence of the results obtained by different research teams. Probably the obtained results are influenced by the calculation formula, whole genome amplification

technique, embryo biopsy day (at the blastocyst development stage), protocols and reagents used during embryo culture and storage, as well as the size of the group studied in the experiment.

In conclusion, the results of the conducted research indicate a relationship between the mitochondrial DNA content and the embryos developmental potential. Further experiments are required to fully evaluate the biological basis of the observed relationships. Nevertheless, the investigated parameter seems to present low utility as an independent embryo selection marker in the in vitro fertilisation procedure.

Keywords: aneuploidy, embryo, embryo selection, embryo transfer, embryogenesis, implantation potential, mitochondria, mitochondrial DNA (mtDNA), mitochondrial score (Ms), in vitro fertilisation, preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A).

10. Bibliografia

1. Pfeiffer, T.; Schuster, S.; Bonhoeffer, S. Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science* **2001**, *292*, 504–507, doi:10.1126/science.1058079.
2. Annesley, S.J.; Fisher, P.R. Mitochondria in Health and Disease. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8070680.
3. Duchen, M.R. Mitochondria and Calcium: From Cell Signalling to Cell Death. *J Physiol* **2000**, *529 Pt 1*, 57–68, doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x.
4. Kroemer, G. Mitochondrial Control of Apoptosis: An Introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *304*, 433–435, doi:10.1016/s0006-291x(03)00614-4.
5. Lenaz, G.; Genova, M.L. Supramolecular Organisation of the Mitochondrial Respiratory Chain: A New Challenge for the Mechanism and Control of Oxidative Phosphorylation. In; 2012; pp. 107–144.
6. Mishra, P.; Chan, D.C. Mitochondrial Dynamics and Inheritance during Cell Division, Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 634–646, doi:10.1038/nrm3877.
7. Herst, P.M.; Rowe, M.R.; Carson, G.M.; Berridge, M. v Functional Mitochondria in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2017**, *8*, 296, doi:10.3389/fendo.2017.00296.
8. Giles, R.E.; Blanc, H.; Cann, H.M.; Wallace, D.C. Maternal Inheritance of Human Mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, *77*, 6715–6719, doi:10.1073/pnas.77.11.6715.
9. Sato, M.; Sato, K. Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA by Diverse Mechanisms to Eliminate Paternal Mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **2013**, *1833*, 1979–1984, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.010.
10. Kaneda, H.; Hayashi, J.I.; Takahama, S.; Taya, C.; Lindahl, K.F.; Yonekawa, H. Elimination of Paternal Mitochondrial DNA in Intraspecific Crosses during Early Mouse Embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 4542–4546, doi:10.1073/pnas.92.10.4542.
11. Shitara, H.; Kaneda, H.; Sato, A.; Inoue, K.; Ogura, A.; Yonekawa, H.; Hayashi, J.I. Selective and Continuous Elimination of Mitochondria Microinjected into Mouse Eggs from Spermatids, but Not from Liver Cells, Occurs throughout Emborogenesis. *Genetics* **2000**, *156*, 1277–1284, doi:10.1093/genetics/156.3.1277.

12. Cummins, J.M.; Wakayama, T.; Yanagimachi, R. Fate of Microinjected Spermatid Mitochondria in the Mouse Oocyte and Embryo. *Zygote* **1998**, *6*, 213–222, doi:10.1017/S0967199498000148.
13. Seli, E.; Wang, T.; Horvath, T.L. Mitochondrial Unfolded Protein Response: A Stress Response with Implications for Fertility and Reproductive Aging. *Fertility and Sterility* **2019**, *111*, 197–204, doi:10.1016/j.fertnstert.2018.11.048.
14. Park, Y.J.; Pang, M.G. Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–27, doi:10.3390/antiox10010098.
15. Sutovsky, P.; Moreno, R.D.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Simerly, C.; Schatten, G. Ubiquitin Tag for Sperm Mitochondria. *Nature* **1999**, *402*, 371–372, doi:10.1038/46466.
16. Wei, W.; Chinnery, P.F. Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans: Implications for Rare and Common Diseases. *Journal of Internal Medicine* **2020**, *287*, 634–644, doi:10.1111/joim.13047.
17. Luo, S.; Valencia, C.A.; Zhang, J.; Lee, N.-C.; Slone, J.; Gui, B.; Wang, X.; Li, Z.; Dell, S.; Brown, J.; et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115*, 13039 LP – 13044, doi:10.1073/pnas.1810946115.
18. Cree, L.M.; Samuels, D.C.; Chinnery, P.F. The Inheritance of Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **2009**, *1792*, 1097–1102, doi:10.1016/j.bbadis.2009.03.002.
19. Otten, A.B.C.; Smeets, H.J.M. Evolutionary Defined Role of the Mitochondrial DNA in Fertility, Disease and Ageing. *Hum Reprod Update* **2015**, *21*, 671–689, doi:10.1093/humupd/dmv024.
20. van Blerkom, J. Mitochondrial Function in the Human Oocyte and Embryo and Their Role in Developmental Competence. *Mitochondrion* **2011**, *11*, 797–813, doi:10.1016/j.mito.2010.09.012.
21. Barritt, J.A.; Kokot, M.; Cohen, J.; Steuerwald, N.; Brenner, C.A. Quantification of Human Ooplasmic Mitochondria. *Reprod Biomed Online* **2002**, *4*, 243–247, doi:10.1016/s1472-6483(10)61813-5.
22. St John, J.C.; Facucho-Oliveira, J.; Jiang, Y.; Kelly, R.; Salah, R. Mitochondrial DNA Transmission, Replication and Inheritance: A Journey from the Gamete through the

Embryo and into Offspring and Embryonic Stem Cells. *Hum Reprod Update* **2010**, *16*, 488–509, doi:10.1093/humupd/dmq002.

23. van Blerkom, J.; Davis, P.; Alexander, S. Differential Mitochondrial Distribution in Human Pronuclear Embryos Leads to Disproportionate Inheritance between Blastomeres: Relationship to Microtubular Organization, ATP Content and Competence. *Human Reproduction* **2000**, *15*, 2621–2633, doi:10.1093/humrep/15.12.2621.
24. Squirrell, J.M.; Schramm, R.D.; Paprocki, A.M.; Wokosin, D.L.; Bavister, B.D. Imaging Mitochondrial Organization in Living Primate Oocytes and Embryos Using Multiphoton Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* **2003**, *9*, 190–201, doi:10.1017/S1431927603030174.
25. st. John, J. The Control of MtDNA Replication during Differentiation and Development. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2014**, *1840*, 1345–1354, doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.036.
26. Fragouli, E.; McCaffrey, C.; Ravichandran, K.; Spath, K.; Grifo, J.A.; Munné, S.; Wells, D. Clinical Implications of Mitochondrial DNA Quantification on Pregnancy Outcomes: A Blinded Prospective Non-Selection Study. *Human Reproduction* **2017**, *32*, 2340–2347, doi:10.1093/humrep/dex292.
27. Ravichandran, K.; McCaffrey, C.; Grifo, J.; Morales, A.; Perloe, M.; Munne, S.; Wells, D.; Fragouli, E. Mitochondrial DNA Quantification as a Tool for Embryo Viability Assessment: Retrospective Analysis of Data from Single Euploid Blastocyst Transfers. *Human Reproduction* **2017**, *32*, 1282–1292, doi:10.1093/humrep/dex070.
28. Fragouli, E.; Spath, K.; Alfarawati, S.; Kaper, F.; Craig, A.; Michel, C.-E.; Kokocinski, F.; Cohen, J.; Munne, S.; Wells, D. Altered Levels of Mitochondrial DNA Are Associated with Female Age, Aneuploidy, and Provide an Independent Measure of Embryonic Implantation Potential. *PLoS Genet* **2015**, *11*, e1005241, doi:10.1371/journal.pgen.1005241.
29. Victor, A.R.; Brake, A.J.; Tyndall, J.C.; Griffin, D.K.; Zouves, C.G.; Barnes, F.L.; Viotti, M. Accurate Quantitation of Mitochondrial DNA Reveals Uniform Levels in Human Blastocysts Irrespective of Ploidy, Age, or Implantation Potential. *Fertil Steril* **2017**, *107*, 34-42.e3, doi:10.1016/j.fertnstert.2016.09.028.
30. Zhang, Q.; Ji, H.; Shi, J.; Wang, L.; Ding, L.; Jiang, Y.; Huang, X.; Qiu, P.; Li, P. Digital PCR Detection of MtDNA/GDNA Ratio in Embryo Culture Medium for Prediction of Embryo Development Potential. *Pharmgenomics Pers Med* **2021**, *14*, 521–531, doi:10.2147/PGPM.S304747.

31. Zhang, X.; Sun, Y.; Dong, X.; Zhou, J.; Sun, F.; Han, T.; Lei, P.; Mao, R.; Guo, X.; Wang, Q.; et al. Mitochondrial DNA and Genomic DNA Ratio in Embryo Culture Medium Is Not a Reliable Predictor for in Vitro Fertilization Outcome. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 5378, doi:10.1038/s41598-019-41801-1.
32. Wang, J.; Diao, Z.; Zhu, L.; Zhu, J.; Lin, F.; Jiang, W.; Fang, J.; Xu, Z.; Xing, J.; Zhou, J.; et al. Trophectoderm Mitochondrial DNA Content Associated with Embryo Quality and Day-5 Euploid Blastocyst Transfer Outcomes. *DNA and Cell Biology* **2021**, *40*, 643–651, doi:10.1089/dna.2020.6271.
33. Du, S.; Huang, Z.; Lin, Y.; Sun, Y.; Chen, Q.; Pan, M.; Zheng, B. Mitochondrial DNA Copy Number in Human Blastocyst: A Novel Biomarker for the Prediction of Implantation Potential. *J Mol Diagn* **2021**, *23*, 637–642, doi:10.1016/j.jmoldx.2021.02.006.
34. Shang, W.; Zhang, Y.; Shu, M.; Wang, W.; Ren, L.; Chen, F.; Shao, L.; Lu, S.; Bo, S.; Ma, S.; et al. Comprehensive Chromosomal and Mitochondrial Copy Number Profiling in Human IVF Embryos. *Reprod Biomed Online* **2018**, *36*, 67–74, doi:10.1016/j.rbmo.2017.10.110.
35. de los Santos, M.J.; Diez Juan, A.; Mifsud, A.; Mercader, A.; Meseguer, M.; Rubio, C.; Pellicer, A. Variables Associated with Mitochondrial Copy Number in Human Blastocysts: What Can We Learn from Trophectoderm Biopsies? *Fertility and Sterility* **2018**, *109*, 110–117, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.09.022.
36. Juan, A.D.; Rubio, C.; Marin, C.; Martinez, S.; Diaz-Gimeno, P.; Riboldi, M.; Al-Asmar, N.; Valbuena, D.; Simon, C. Mitochondrial DNA Content as a Viability Score in Human Euploid Embryos: Less Is Better. *Fertility and Sterility* **2015**, *104*, e311, doi:10.1016/j.fertnstert.2015.07.972.
37. Treff, N.R.; Zhan, Y.; Tao, X.; Olcha, M.; Han, M.; Rajchel, J.; Morrison, L.; Morin, S.J.; Scott, R.T.J. Levels of Trophectoderm Mitochondrial DNA Do Not Predict the Reproductive Potential of Sibling Embryos. *Hum Reprod* **2017**, *32*, 954–962, doi:10.1093/humrep/dex034.
38. El-Damen, A.; Elkhatib, I.; Bayram, A.; Arnanz, A.; Abdala, A.; Samir, S.; Lawrenz, B.; de Munck, N.; Fatemi, H.M. Does Blastocyst Mitochondrial DNA Content Affect Miscarriage Rate in Patients Undergoing Single Euploid Frozen Embryo Transfer? *J Assist Reprod Genet* **2021**, *38*, 595–604, doi:10.1007/s10815-020-02050-8.
39. Klimczak, A.M.; Pacheco, L.E.; Lewis, K.E.; Massahi, N.; Richards, J.P.; Kearns, W.G.; Saad, A.F.; Crochet, J.R. Embryonal Mitochondrial DNA: Relationship to Embryo

Quality and Transfer Outcomes. *J Assist Reprod Genet* **2018**, *35*, 871–877, doi:10.1007/s10815-018-1147-z.

40. Ritu, G.; Veerasigamani, G.; Ashraf, M.C.; Singh, S.; Laheri, S.; Modi, D. No Association of Mitochondrial DNA Levels in Trophectodermal Cells with the Developmental Competence of the Blastocyst and Pregnancy Outcomes. *bioRxiv* **2019**, 1–22, doi:10.1101/629956.
41. Scott, R.T.; Sun, L.; Zhan, Y.; Marin, D.; Tao, X.; Seli, E. Mitochondrial DNA Content Is Not Predictive of Reproductive Competence in Euploid Blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* **2020**, *41*, 183–190, doi:10.1016/j.rbmo.2020.04.011.
42. Lee, Y.X.; Chen, C.H.; Lin, S.Y.; Lin, Y.H.; Tzeng, C.R. Adjusted Mitochondrial DNA Quantification in Human Embryos May Not Be Applicable as a Biomarker of Implantation Potential. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **2019**, *36*, 1855–1865, doi:10.1007/s10815-019-01542-6.
43. Arnanz, A.; de Munck, N.; Bayram, A.; El-Damen, A.; Abdalla, A.; ElKhatib, I.; Melado, L.; Lawrenz, B.; Fatemi, H.M. Blastocyst Mitochondrial DNA (MtDNA) Is Not Affected by Oocyte Vitrification: A Sibling Oocyte Study. *J Assist Reprod Genet* **2020**, *37*, 1387–1397, doi:10.1007/s10815-020-01795-6.
44. de Munck, N.; Liñán, A.; Elkhatib, I.; Bayram, A.; Arnanz, A.; Rubio, C.; Garrido, N.; Lawrenz, B.; Fatemi, H.M. MtDNA Dynamics between Cleavage-Stage Embryos and Blastocysts. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **2019**, *36*, 1867–1875, doi:10.1007/s10815-019-01544-4.
45. Boynukalin, F.K.; Gultomruk, M.; Cavkaytar, S.; Turgut, E.; Findikli, N.; Serdarogullari, M.; Coban, O.; Yarkiner, Z.; Rubio, C.; Bahceci, M. Parameters Impacting the Live Birth Rate per Transfer after Frozen Single Euploid Blastocyst Transfer. *PLoS ONE* **2020**, *15*, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0227619.
46. European Society of Human Reproduction and Embryology More than 8 Million Babies Born from IVF since the World's First in 1978: European IVF Pregnancy Rates Now Steady at around 36 Percent, According to ESHRE Monitoring. Available online: www.sciencedaily.com/releases/2018/07/180703084127.htm.
47. Fragouli, E.; Alfarawati, S.; Spath, K.; Jaroudi, S.; Sarasa, J.; Enciso, M.; Wells, D. The Origin and Impact of Embryonic Aneuploidy. *Hum Genet* **2013**, *132*, 1001–1013, doi:10.1007/s00439-013-1309-0.

48. Cozzolino, M.; Marin, D.; Sisti, G. New Frontiers in IVF: MtDNA and Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2019**, *17*, 55, doi:10.1186/s12958-019-0501-z.
49. Liss, J.; Chromik, I.; Szczyglińska, J.; Jagiełło, M.; Łukaszuk, A.; Łukaszuk, K. Current Methods for Preimplantation Genetic Diagnosis. *Ginekologia Polska* **2016**, *87*, 522–526, doi:10.5603/GP.2016.0037.
50. Krzysztof Łukaszuk; Agnieszka Kuczyńska; Sebastian Pukszta; Paweł Kuć; Waldemar Kuczyński; Jakub Łukaszuk; Joanna Liss; Izabela Wocławek-Potocka First in the World Application of next Generation Sequencing in Preimplantation Genetic Diagnostics in Clinical Practice - a Case Report. *Wiadomości Lekarskie* **2016**, *69*, 105–108.
51. Lukaszuk, K.; Jakiel, G.; Kuczynski, W.; Pukszta, S.; Liss, J.; Plociennik, L.; Lukaszuk, A.; Pastuszek, E. Next Generation Sequencing for Preimplantation Genetic Testing of Blastocysts Aneuploidies in Women of Different Ages. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **2015**, *23*, 163–166, doi:10.5604/12321966.1196874.
52. Wu, F.S.-Y.; Weng, S.-P.; Shen, M.-S.; Ma, P.-C.; Wu, P.-K.; Lee, N.-C. Suboptimal Trophectoderm Mitochondrial DNA Level Is Associated with Delayed Blastocyst Development. *J Assist Reprod Genet* **2021**, *38*, 587–594, doi:10.1007/s10815-020-02045-5.
53. May-Panloup, P.; Boguenet, M.; el Hachem, H.; Bouet, P.-E.; Reynier, P. Embryo and Its Mitochondria. *Antioxidants* **2021**, *10*, 139, doi:10.3390/antiox10020139.
54. Leese, H.J.; Houghton, F.D.; Macmillan, D.A.; Donnay, I. Metabolism of the Early Embryo: Energy Production and Utilization. *ART and the Human Blastocyst* **2001**, 61–68, doi:10.1007/978-1-4613-0149-3_6.
55. Chappel, S. The Role of Mitochondria from Mature Oocyte to Viable Blastocyst. *Obstetrics and Gynecology International* **2013**, *2013*, 1–10, doi:10.1155/2013/183024.
56. de Lima, C.B.; dos Santos, É.C.; Ispada, J.; Fontes, P.K.; Nogueira, M.F.G.; dos Santos, C.M.D.; Milazzotto, M.P. The Dynamics between in Vitro Culture and Metabolism: Embryonic Adaptation to Environmental Changes. *Scientific Reports* **2020**, *10*, 1–14, doi:10.1038/s41598-020-72221-1.
57. Moraes, C.R.; Meyers, S. The Sperm Mitochondrion: Organelle of Many Functions. *Animal Reproduction Science* **2018**, *194*, 71–80, doi:10.1016/j.anireprosci.2018.03.024.
58. Durairajanayagam, D.; Singh, D.; Agarwal, A.; Henkel, R. Causes and Consequences of Sperm Mitochondrial Dysfunction. *Andrologia* **2021**, *53*, 1–15, doi:10.1111/and.13666.

59. Wei, Y.H.; Kao, S.H. Mitochondrial DNA Mutation and Depletion Are Associated with Decline of Fertility and Motility of Human Sperm . *Zoological Studies* 2000, *39*, 1–12.
60. Vertika, S.; Singh, K.K.; Rajender, S. Mitochondria, Spermatogenesis, and Male Infertility – An Update. *Mitochondrion* **2020**, *54*, 26–40, doi:10.1016/j.mito.2020.06.003.
61. van der Reest, J.; Nardini Cecchino, G.; Haigis, M.C.; Kordowitzki, P. Mitochondria: Their Relevance during Oocyte Ageing. *Ageing Research Reviews* **2021**, *70*, 87–100, doi:10.1016/j.arr.2021.101378.
62. Chiang, J.L.; Shukla, P.; Pagidas, K.; Ahmed, N.S.; Karri, S.; Gunn, D.D.; Hurd, W.W.; Singh, K.K. Mitochondria in Ovarian Aging and Reproductive Longevity. *Ageing Research Reviews* **2020**, *63*, 101168, doi:10.1016/j.arr.2020.101168.
63. Park, S.U.; Walsh, L.; Berkowitz, K.M. Mechanisms of Ovarian Aging. *Reproduction* **2021**, *162*, R19–R33, doi:10.1530/REP-21-0022.
64. Busnelli, A.; Navarra, A.; Levi-Setti, P.E. Qualitative and Quantitative Ovarian and Peripheral Blood Mitochondrial Dna (Mtdna) Alterations: Mechanisms and Implications for Female Fertility. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–16, doi:10.3390/antiox10010055.
65. Heinonen, S.; Buzkova, J.; Muniandy, M.; Kaksonen, R.; Ollikainen, M.; Ismail, K.; Hakkarainen, A.; Lundbom, J.; Lundbom, N.; Vuolteenaho, K.; et al. Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes* **2015**, *64*, 3135–3145, doi:10.2337/db14-1937.
66. Cunarro, J.; Casado, S.; Lugilde, J.; Tovar, S. Hypothalamic Mitochondrial Dysfunction as a Target in Obesity and Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 283, doi:10.3389/fendo.2018.00283.
67. Fu, L.; Luo, Y.X.; Liu, Y.; Liu, H.; Li, H.Z.; Yu, Y. Potential of Mitochondrial Genome Editing for Human Fertility Health. *Frontiers in Genetics* **2021**, *12*, doi:10.3389/fgene.2021.673951.
68. Yahata, N.; Matsumoto, Y.; Omi, M.; Yamamoto, N.; Hata, R. TALEN-Mediated Shift of Mitochondrial DNA Heteroplasmy in MELAS-IPSCs with m.13513G>A Mutation. *Sci Rep* **2017**, *7*, 15557, doi:10.1038/s41598-017-15871-y.
69. Yang, Y.; Wu, H.; Kang, X.; Liang, Y.; Lan, T.; Li, T.; Tan, T.; Peng, J.; Zhang, Q.; An, G.; et al. Targeted Elimination of Mutant Mitochondrial DNA in MELAS-IPSCs by MitoTALENs. *Protein Cell* **2018**, *9*, 283–297, doi:10.1007/s13238-017-0499-y.
70. Wang, B.; Lv, X.; Wang, Y.; Wang, Z.; Liu, Q.; Lu, B.; Liu, Y.; Gu, F. CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis at Microhomologous Regions of Human

Mitochondrial Genome. *Sci China Life Sci* **2021**, *64*, 1463–1472, doi:10.1007/s11427-020-1819-8.

71. Craven, L.; Tang, M.X.; Gorman, G.S.; de Sutter, P.; Heindryckx, B. Novel Reproductive Technologies to Prevent Mitochondrial Disease. *Human Reproduction Update* **2017**, *23*, 501–519, doi:10.1093/humupd/dmx018.
72. Reznichenko, A.S.; Huyser, C.; Pepper, M.S. Mitochondrial Transfer: Implications for Assisted Reproductive Technologies. *Applied and Translational Genomics* **2016**, *11*, 40–47, doi:10.1016/j.atg.2016.10.001.
73. Kristensen, S.G.; Humaidan, P.; Coetzee, K. Mitochondria and Reproduction: Possibilities for Testing and Treatment. *Panminerva Medica* **2019**, 82–96, doi:10.23736/S0031-0808.18.03510-3.
74. Mobarak, H.; Heidarpour, M.; Tsai, P.S.J.; Rezabakhsh, A.; Rahbarghazi, R.; Nouri, M.; Mahdipour, M. Autologous Mitochondrial Microinjection; A Strategy to Improve the Oocyte Quality and Subsequent Reproductive Outcome during Aging. *Cell and Bioscience* **2019**, *9*, 1–15, doi:10.1186/s13578-019-0360-5.
75. Cohen, J.; Alikani, M.; Garrisi, J.G.; Willadsen, S. Micromanipulation of Human Gametes and Embryos: Ooplasmic Donation at Fertilization VIDEO. *Hum Reprod Update* **1998**, *4*, 195–196, doi:10.1093/humupd/4.2.195.
76. Cohen, J.; Scott, R.; Schimmel, T.; Levron, J.; Willadsen, S. Birth of Infant after Transfer of Anucleate Donor Oocyte Cytoplasm into Recipient Eggs. *Lancet* 1997, *350*, 186–187.
77. Cohen, J.; Scott, R.; Alikani, M.; Schimmel, T.; Munné, S.; Levron, J.; Wu, L.; Brenner, C.; Warner, C.; Willadsen, S. Ooplasmic Transfer in Mature Human Oocytes. *Mol Hum Reprod* **1998**, *4*, 269–280, doi:10.1093/molehr/4.3.269.
78. Woods, D.C.; Tilly, J.L. Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer (AUGMENT) in Human Assisted Reproduction. *Semin Reprod Med* **2015**, *33*, 410–421, doi:10.1055/s-0035-1567826.
79. Woods, D.C.; Tilly, J.L. Isolation, Characterization and Propagation of Mitotically Active Germ Cells from Adult Mouse and Human Ovaries. *Nature Protocols* **2013**, *8*, 966–988, doi:10.1038/nprot.2013.047.
80. Jiang, Z.; Shen, H. Mitochondria: Emerging Therapeutic Strategies for Oocyte Rescue. *Reproductive Sciences* **2021**, doi:10.1007/s43032-021-00523-4.

81. Lee, K. An Ethical and Legal Analysis of Ovascience – A Publicly Traded Fertility Company and Its Lead Product AUGMENT. *American Journal of Law and Medicine* **2018**, *44*, 508–528, doi:10.1177/0098858818821135.
82. Powell, K. Born or Made? Debate on Mouse Eggs Reignites. *Nature* 2006, *441*, 795.
83. Grieve, K.M.; McLaughlin, M.; Dunlop, C.E.; Telfer, E.E.; Anderson, R.A. The Controversial Existence and Functional Potential of Oogonial Stem Cells. *Maturitas* **2015**, *82*, 278–281, doi:10.1016/j.maturitas.2015.07.017.
84. Gosden, R.G.; Johnson, M.H. Can Oocyte Quality Be Augmented? *Reprod Biomed Online* 2016, *32*, 551–555.
85. Troubled OvaScience Cuts Half of Workforce Available online: https://www.biopharmadive.com/news/troubled-ovascience-cuts-half-of-workforce/514160/.
86. OvaScience Sued by Shareholders for Over-Hyped Fertility Treatment Available online: https://www.courthousenews.com/ovascience-sued-by-shareholders-for-over-hyped-fertility-treatment/.
87. Yerushalmi, G.M.; Shavit, T.; Avraham, S.; Youngster, M.; Kedem, A.; Gat, I.; Dorofeyeva, U.S.; Mashiach, S.; Schiff, E.; Shulman, A.; et al. Day 5 Vitrified Blastocyst Transfer versus Day 6 Vitrified Blastocyst Transfer in Oocyte Donation Program. *Scientific Reports* **2021**, *11*, 10715, doi:10.1038/s41598-021-90238-y.
88. Haas, J.; Meriano, J.; Laskin, C.; Bentov, Y.; Barzilay, E.; Casper, R.F.; Cadesky, K. Clinical Pregnancy Rate Following Frozen Embryo Transfer Is Higher with Blastocysts Vitrified on Day 5 than on Day 6. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **2016**, *33*, 1553–1557, doi:10.1007/s10815-016-0818-x.
89. Bourdon, M.; Pocate-Cheriet, K.; Finet de Bantel, A.; Grzegorczyk-Martin, V.; Amar Hoffet, A.; Arbo, E.; Poulain, M.; Santulli, P. Day 5 versus Day 6 Blastocyst Transfers: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Outcomes. *Human Reproduction* **2019**, *34*, 1948–1964, doi:10.1093/humrep/dez163.
90. Shapiro, B.S.; Richter, K.S.; Harris, D.C.; Daneshmand, S.T. A Comparison of Day 5 and Day 6 Blastocyst Transfers. *Fertility and Sterility* **2001**, *75*, 1126–1130, doi:10.1016/S0015-0282(01)01771-X.
91. Diez-Juan, A.; Rubio, C.; Marin, C.; Martinez, S.; Al-Asmar, N.; Riboldi, M.; Díaz-Gimeno, P.; Valbuena, D.; Simón, C. Mitochondrial DNA Content as a Viability Score in Human Euploid Embryos: Less Is Better. *Fertil Steril* **2015**, *104*, 534-41.e1, doi:10.1016/j.fertnstert.2015.05.022.

11. Publikacje będące przedmiotem rozprawy

12. Oświadczenia współautorów