



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivo Karač

**Važnost mitohondrijske DNA u ranom  
razvoju ljudskih zametaka**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivo Karač

**The importance of mitochondrial DNA in  
early human embryo development**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

Ovaj doktorski rad je izrađen u IVF laboratoriju Pacific Fertility Institute na Sjevernomarijanskom otočju, Sjedinjene Američke Države, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Romane Gračan i dr. sc. Sanje Vujisić Živković u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **Zahvale**

## Životopis mentora

Dr. sc. Romana Gračan izvanredni je profesor u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2005. godine s temom "Promjena staništa glavate želve *Caretta caretta* L. tijekom ontogeneze", i stekla zvanje diplomirani inženjer biologije, usmjerenje: ekologija. Doktorirala je na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu 2012. godine s temom "Biologija kostelja (*Squalus acanthias* Linnaeus, 1758) u sjevernom Jadranu" pod vodstvom prof. dr. sc. Gordane Lacković-Venturin. Od 2006. godine zaposlena je kao asistent-znanstveni novak na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, od 2012. kao viši asistent – poslijedoktorand, 2017. godina postaje docent, a 2023. godine izvanredni profesor na istoj instituciji. Bavi se primjenom histološko-histokemijskih metoda u istraživanju biologije i ekologije morskih kralješnjaka i antropogenih zagađenja u vodenim ekosustavima. Objavljeni radovi obuhvaćaju područje razvojne biologije (reproduktivna biologija i demografija), ekologije morskih beskrležnjaka i kralješnjaka, te histopatološka istraživanja na laboratorijskim životinjama.

Do sada je objavila 33 originalna znanstvena rada te 30 kongresnih priopćenja objavljenih u zbornicima s međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova.

Kao nositelj kolegija sudjeluje u izvođenju predavanja, seminara, praktikumskih vježbi te laboratorijske nastave iz kolegija Histologija i histokemija, Osnove histologije i embriologije, Biologija razvoja i Razvojna biologija životinja. Mentor je dvije doktorske disertacije, voditelj 6 diplomskih radova, 20 završnih radova te autor više skripti za studente.

Aktivno sudjeluje u popularizaciji znanosti kroz manifestacije Dan i Noć PMF-a, predavanja na Festivalu znanosti, Tehnički muzej Zagreb, te kao član u organizaciji Smotre Sveučilišta, Studentski Centar, Sveučilište u Zagrebu. Učestalo sudjeluje u organizacijama znanstvenih kongresa poput Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS), Simpozija o biologiji slatkih voda s međunarodnim sudjelovanjem i Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Član je Hrvatskog biološkog društva (HBD) i Hrvatskog udruženja slatkovodnih ekologa (HUSEk). Više detalja o publikacijama dostupno je na: CRORIS: <https://www.croris.hr/osobe/profil/1643>

## Životopis mentora

Dr. sc. Sanja Vujisić Živković je voditelj laboratorija u Mia Poliklinici Pronatal, Rijeka. Diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 1986. godine i stekla zvanje diplomirani inženjer biologije, usmjerenje: Eksperimentalna biologija. Iste godine je upisala Poslijediplomski studij prirodnih znanosti i obranila rad naslovljen "Histokemijsko dokazivanje olova u organima šarana (*Cyprinus carpio* L.)" na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu 1991. Doktorsku disertaciju naslovljenu "Procjena receptivnosti endometrija u spontanim i stimuliranim ovarijskim ciklusima" izradila je u Klinici za ginekologiju i porodništvo KB "Sveti Duh" Zagreb, koju je obranila 1998. na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Završila je 1994. poslijediplomski studij iz metoda IVF-a u Tel Avivu, Izrael. U zvanje znanstvenog suradnika Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu izabrana je 2005., te u zvanje višeg znanstvenog suradnika izabrana je 2009. (područje biomedicina i zdravstvo – polje kliničke medicinske znanosti).

Od 1987. do 1991. radila je u Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu kao asistent-istraživač, gdje je sudjelovala u istraživanjima i nastavi iz predmeta Histologija i Razvojna biologija.

Od 1993. do 2012. radi kao biolog/klinički embriolog u Klinici za ginekologiju i porodništvo KB „Sveti Duh“ Zagreb u svojstvu voditelja Laboratorija za humanu reprodukciju. Uvela je postupke MPO i organizirala rad Laboratorija. Od strane ESHRE-a (European Society of Human Reproduction and Embriology) dobila je 2008. licencu kao senior embriolog.

Od svibnja 2012. do listopada 2024. radi kao biolog/klinički embriolog u Poliklinici BetaPlus, Zagreb, gdje također uvodi postupke MPO i organizira rad Laboratorija, te s istim zaduženjima d studenog 2024. radi u Mia Poliklinici Pronatal, Rijeka.

Do sada je objavila 30 originalnih znanstvenih radova te 10 kongresnih priopćenja objavljenih u zbornicima s međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova, mentor je 2 doktorska rada. Recenzent je u indeksiranim časopisima i pri ESHRE-u.

Mentor je više od deset mladih kliničkih embriologa, te je predsjednica Povjerenstva za edukaciju pri Hrvatskom društvu kliničkih embriologa."

## **VAŽNOST MITOHONDRIJSKE DNA U RANOM RAZVOJU LJUDSKIH ZAMETAKA**

IVO KARAČ

Tijekom posljednja dva desetljeća mtDNA je proučavana kao potencijalni biomarker pri selekciji zametaka tijekom IVF postupka. Međutim, još uvijek ne postoji znanstveni konsenzus o njejoj kliničkoj primjeni i važnosti tijekom ranog razvoja ljudskih zametaka. U ovo istraživanje uključeni su morfokinetski i bioinformatički podatci 159 ekspanziranih blastocista nastalih postupcima izvantjelesne oplodnje, podrijetlom od žena mlađe reproduktivne dobi (< 35 godina). Podatke o morfokinetici zametaka prikupio sam embriološkim praćenjem razvoja zametaka, dok su ploidija i količina mtDNA blastocista utvrđene predimplantacijskim genetičkim testiranjem za aneuploidiju tehnologijom sekvenciranja nove generacije. Ustanovio sam korelaciju između mtDNA blastocista u odnosu na morfologiju blastocista i dana njihova nastanka te morfologije zametaka koji su prethodili stadiju blastociste. Blastociste s nižim količinama mtDNA imale su sporiju blastulaciju, nižu morfološku ocjenu te neoptimalniji razvoj tijekom staničnih stadija i stadija morule. Nadalje, ploidija zametka, dob majke i spolni kromosomi nemaju značajan utjecaj na količinu mtDNA kod zametaka žena mlađih od 35 godina. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem daju nam nove uvide o međuodnosu mtDNA i morfokinetike zametaka tijekom predimplantacijskog razvoja.

(100 stranica, 40 slika, 6 tablica, 160 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: mitohondrijska DNA, blastocista, ploidija, morfologija zametaka, predimplantacijsko genetičko testiranje, sekvenciranje nove generacije

Mentor: izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

Mentor: dr. sc. Sanja Vujisić Živković, viša znan. suradnica

Ocjenjivači:

nasl. prof. dr. sc. Feodora Stipoljev, Klinička bolnica "Sveti Duh", Zagreb

prof. dr. sc. Domagoj Đikić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

nasl. izv. prof. dr. sc. Natalija Novokmet, Institut za antropologiju, Zagreb

**THE IMPORTANCE OF MITOCHONDRIAL DNA IN EARLY HUMAN EMBRYO  
DEVELOPMENT**

IVO KARAC

Over the past two decades, mtDNA has been studied as a potential biomarker for embryo selection during IVF procedures. However, its reliability for embryo selection and significance during early human embryo development remain uncertain. This research analyzed morphokinetic and bioinformatics data from 159 expanded blastocysts created through IVF and originating from women of younger reproductive age (<35 years). Morphokinetic data were collected via embryo developmental monitoring, while ploidy and mtDNA content were determined by preimplantation genetic testing using next-generation sequencing. Blastocyst mtDNA content correlated with blastocyst morphology, the day of blastocyst formation, and the morphology of embryo stages preceding the blastocyst stage. Blastocysts with lower mtDNA levels exhibited slower blastulation, lower morphological grades, and suboptimal development during cleavage and morula stages. Additionally, embryo ploidy, maternal age, and embryo sex showed no correlation with mtDNA levels. These findings offer further insights into the interplay between blastocyst mtDNA content and preimplantation embryo morphokinetics.

(100 pages, 40 figures, 6 tables, 160 references, original in Croatian)

Keywords: mitochondrial DNA, blastocyst, ploidy, embryo morphology, preimplantation genetic testing, next-generation sequencing

Supervisor: Romana Gračan, PhD, Assoc. Prof.  
Supervisor: Sanja Vujisić Živković, PhD, Sr. Sci. Assoc.

Reviewers:

Feodora Stipoljev, PhD, Full Prof., Clinical Hospital "Sveti Duh", Zagreb

Domagoj Đikić, PhD, Full Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Natalija Novokmet, PhD, Assoc. Prof., Institute for Anthropological Research, Zagreb

## SADRŽAJ

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD                                                                                             | 1  |
| 2. LITERATURNI PREGLED                                                                              | 3  |
| 2.1. Liječenje neplodnosti                                                                          | 3  |
| 2.1.1. Medicinski potpomognuta oplodnja                                                             | 3  |
| 2.2. Procjena kvalitete zametaka                                                                    | 5  |
| 2.2.1. Procjena zrelosti i morfologije oocita                                                       | 7  |
| 2.2.2. Procjena oplodnje (zigota)                                                                   | 8  |
| 2.2.3. Procjena kvalitete zametaka u staničnom stadiju (2. i 3. dan)                                | 10 |
| 2.2.4. Procjena kvalitete zametaka u stadiju morule (4. dan)                                        | 11 |
| 2.2.5. Procjena kvalitete zametaka u stadiju blastociste (5. i 6. dan)                              | 12 |
| 2.3. Biopsija zametaka i predimplantacijsko genetičko testiranje                                    | 15 |
| 2.3.1. pristupi biopsiji zametaka tijekom IVF postupka                                              | 16 |
| 2.3.2. Predimplantacijsko genetičko testiranje za aneuploidiju                                      | 21 |
| 2.4. Mitohondriji i mitohondrijska DNA                                                              | 22 |
| 2.4.1. Struktura i funkcija mitohondrija                                                            | 22 |
| 2.4.2. Mitohondrijska DNA                                                                           | 25 |
| 2.4.3. Mitohondriji i mitohondrijska DNA oocita                                                     | 27 |
| 2.4.4. Mitohondriji i mitohondrijska DNA predimplantacijskih zametaka                               | 29 |
| 2.5. Metabolizam predimplantacijskih zametaka                                                       | 31 |
| 2.5.1. Razlike metabolizma staničnih stadija zametka, morule i blastociste                          | 32 |
| 3. MATERIJALI I METODE                                                                              | 33 |
| 3.1. Ispitanici                                                                                     | 33 |
| 3.2. Bioinformatički i morfokinetski podatci te kriteriji za razvrstavanje blastocista po skupinama | 34 |
| 3.3. Uvjeti kultivacije zametaka                                                                    | 36 |
| 3.4. Procjena morfologije, kinetike diobe stanica i ocjenjivanje zametaka                           | 37 |
| 3.4.1. Procjena oplodnje oocita (1. dan kultivacije)                                                | 38 |
| 3.4.2. Procjena morfologije zametaka (2. i 3. dan kultivacije)                                      | 38 |
| 3.4.3. Procjena morfologije zametaka (4. dan kultivacije)                                           | 38 |
| 3.4.4. Procjena morfologije zametaka (5. i 6. dan kultivacije)                                      | 39 |

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5. Biopsija blastocista                                                                                                                  | 39 |
| 3.6. Predimplantacijsko genetičko testiranje za aneuploidiju tehnologijom sekvenciranja nove generacije                                    | 41 |
| 3.7. Određivanje omjera mitohondrijske i jezgrine DNA                                                                                      | 43 |
| 3.8. Statistička analiza                                                                                                                   | 44 |
| 3.9. Cilj i hipoteze istraživanja                                                                                                          | 45 |
| 4. REZULTATI                                                                                                                               | 46 |
| 4.1. Osnovne karakteristike analiziranih blastocista                                                                                       | 46 |
| 4.2. Ovisnost razine mitohondrijske DNA, ploidije blastociste, morfologije blastociste i dana razvoja potpuno ekspanzirane blastociste     | 49 |
| 4.3. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o spolnim kromosomima zametka                                                          | 51 |
| 4.4. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste i dobi majke                                                                           | 53 |
| 4.5. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o broju stanica staničnih stadija zametka                                              | 55 |
| 4.6. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o stupnju fragmentacije zametka                                                        | 58 |
| 4.7. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o morfološkoj ocjeni staničnih stadija zametka                                         | 61 |
| 4.8. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o stupnju kompakcije zametka                                                           | 64 |
| 4.9. Klasifikacija niskokvalitetnih blastocista pomoću razina mitohondrijske DNA                                                           | 66 |
| 5. RASPRAVA                                                                                                                                | 68 |
| 5.1. Mitohondrijska DNA blastociste i dob majke                                                                                            | 69 |
| 5.2. Mitohondrijska DNA blastociste i spolni kromosomi zametka                                                                             | 70 |
| 5.3. Mitohondrijska DNA blastociste i morfologija razvojnih stadija zametaka koji su prethodili stadiju blastociste (dan-2, dan-3 i dan-4) | 71 |
| 5.4. Mitohondrijska DNA blastociste i dan razvoja potpuno ekspanzirane blastociste                                                         | 72 |
| 5.5. Mitohondrijska DNA blastociste i morfologija euploidne blastociste                                                                    | 72 |
| 5.6. Moguće objašnjenje korelacije razine mtDNA i morfološke ocjene te kinetike razvoja zametaka                                           | 73 |
| 5.7. Mitohondrijska DNA blastociste i ploidija blastociste                                                                                 | 75 |

|                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.8. Mitohondrijska DNA kao novi biomarker pri selekciji zametka nastalih u postupcima izvantjelesne oplodnje | 77  |
| 6. ZAKLJUČCI                                                                                                  | 80  |
| 7. POPIS LITERATURE                                                                                           | 82  |
| 8. ŽIVOTOPIS AUTORA                                                                                           | 100 |

## 1. UVOD

Medicinski potpomognuta oplodnja (MPO) uvelike je definirala naše znanje o ljudskoj predimplantacijskoj embriologiji i genetici. Prije začetka MPO, spoznaje o ranom razvoju zametaka uglavnom su temeljene na životinjskim modelima, koji nisu najidealniji izbor ako želimo detaljno razumjeti ljudski embrionalni razvoj. Postoje brojne sličnosti ljudskih i životinjskih modela, ali postoje i brojne razlike, od onih vidljivih lupom i mikroskopom, do onih koje se jedino mogu detektirati metodama molekularne biologije. Od vremena početaka MPO, kada se za oplodnju isključivo koristila inseminacija *in vitro* i kada su zametci kultivirani u nespecifičnim medijima i inkubatorima, do složene tehnologije današnjice proteklo je pet desetljeća obilježenih znanstvenim i tehnološkim napretkom. Danas se laboratoriji diljem svijeta oslanjaju na sofisticirane i posebno dizajnirane medije, inkubatore, mikroskope te alate sposobne za obavljanje mikrozahvata na staničnoj i substaničnoj razini. Nadalje, od kada je MPO uspostavila jaču sinergiju s genetikom dobili smo uvid u genom zametaka. Tijekom postupka MPO, danas je moguće učiniti biopsiju zametaka te analizirati genetski potencijal zametka sa sve većom preciznošću. Nakon biopsije, zametci se individualno kriopohranjuju te ostaju kriopohranjeni do rezultata genetičkih analiza i prijenosa zametaka u materijšte. Predimplantacijsko genetičko testiranje za aneuploidiju (*engl.* preimplantation genetic testing for aneuploidy; PGT-A) je metoda kojom se analizira kromosomski status, odnosno ploidnost zametaka stvorenih u postupcima MPO. Tehnologija sekvenciranja nove generacije NGS (*engl.* next-generation sequencing) PGT-A omogućuje brzo i učinkovito sekvenciranje cjelokupnog genoma analiziranih stanica zametka a osim uvida u jezgrinu DNA (*engl.* nuclear DNA; nDNA), omogućuje i analizu mitohondrijske DNA (*engl.* mitochondrial DNA ;mtDNA). Mitohondriji i mtDNA usko su povezani s proizvodnjom adenosin-trifosfata (*engl.* adenosine triphosphate; ATP), koji je glavni izvor energije u gotovo svim ljudskim stanicama te je zdrava mtDNA preduvjet za optimalno funkcioniranje naših tijela. Iako raspolazemo širokim znanjem o važnosti mtDNA u ljudskim somatskim stanicama, istraživanje mtDNA u ljudskim gametama i predimplantacijskim zamecima još uvijek je mlado područje znanstvenog interesa koje svoje proljeće doživljava tek posljednja dva desetljeća evolucijom tehnologije i metodologije koje su pratile razvoj MPO. Važnost mtDNA u ranim ljudskim zamecima trenutno nije u potpunosti poznata te još uvijek ne

postoji znanstveni konsenzus o interpretaciji i mogućoj primjeni mtDNA pri selekciji zametaka tijekom MPO postupaka. Iz navedenih razloga, fokus ovog rada usmjeren je na važnost mtDNA tijekom ranog razvoja ljudskih zametaka. Rezultati ovog istraživanja trebali bi nam omogućiti bolje shvaćanje mtDNA i njene dinamike u predimplantacijskim zamecima. Ovi navodi će se detaljnije analizirati u daljnjem tekstu te će se do sada nerazjašnjena dinamika mtDNA tijekom predimplantacijskog razdoblja pokušati objasniti modelima temeljenim na rezultatima ovog istraživanja i dosadašnjim znanstvenim saznanjima.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Liječenje neplodnosti

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (*engl.* World Health Organization; WHO) neplodnost je bolest ženskog i muškog reproduktivnog sustava definirana nemogućnošću ostvarivanja trudnoće prirodnim putem nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih seksualnih odnosa (World Health Organization 2023). Najnovije procjene na svjetskoj razini ukazuju da neplodnost pogađa otprilike svaku šestu odraslu osobu. Neplodnost se može podijeliti na primarnu i sekundarnu. Primarna neplodnost je nemogućnost ostvarivanja trudnoće, dok je sekundarna neplodnost definirana kao nemogućnost trudnoće nakon prijašnjih uspješnih trudnoća odnosno rođenja jednog djeteta ili više djece (Mascarenhas i sur. 2012). Ovisno o dijelu svijeta, u 20-35 % slučajeva uzrok neplodnosti je ženski čimbenik, u 20-30 % uzrok je muški čimbenik, u 25-40 % slučajeva do trudnoće ne dolazi zbog udruženih muških i ženskih čimbenika, dok se u 10-20 % slučajeva uzrok neplodnosti ne može identificirati (Chowdhury i sur. 2017; European Society of Human Reproduction and Embryology 2014). Liječenje neplodnosti se uglavnom oslanja na metode MPO, koje su ujedno najčešći i najvažniji pristup pri liječenju neplodnosti. Sinergijom znanstvenih saznanja i tehnološkog napretka, MPO laboratoriji usvajaju nove metode i tehnologije kao što su kriopohrana gameta, zametaka i reproduktivnih tkiva, izvantjelesno dozrijevanje gameta (*engl.* in vitro maturation; IVM), inkubatore sa sposobnošću snimanja i vizualizacije razvoja zametaka ubrzavanjem (*engl.* time-lapse incubator; time-lapse inkubator), biopsiju i genetske analize zametaka te ostale mikromanipulacijske tehnologije.

#### 2.1.1. Medicinski potpomognuta oplodnja

MPO je visokospecijalizirana grana biomedicine kojom se liječi ljudska neplodnost. Od rođenja Louise Brown, prve osobe začete *in vitro* prošlo je 47 godina (Zhao i sur. 2011). Od tada je više od 12 milijuna djece rođeno uz pomoć postupaka MPO (Zhang i sur. 2019), uz trenutni globalni porast od približno 700 000 djece godišnje (Kupka i sur. 2024). MPO može biti homologna ili heterologna. U homolognim postupcima koriste se gamete neplodnog para, dok se u heterolognim zahvatima koriste gamete darovateljica i

darovatelja. Metode MPO su inseminacija te izvantjelesna oplodnja (*engl.* in vitro fertilization; IVF).

Postupci inseminacije su jednostavnije metode MPO. Za vrijeme ovulacijskog perioda menstrualnog ciklusa spermiji pročišćeni iz sjemene tekućine injiciraju se unutar maternice (intrauterina inseminacija; IUI) te se moguća oplodnja oocite i daljnji razvoj zametka događa unutar tijela žene (Kop i sur. 2019).

IVF je složeniji način liječenja neplodnosti. Postoje dva osnovna oblika IVF-a: konvencionalna *in vitro* fertilizacija (*engl.* conventional in vitro fertilization; konvencionalni IVF) i intracitoplazmatska spermalna injekcija (*engl.* intracytoplasmic sperm injection; ICSI). Konvencionalni IVF je najranije korišteni postupak IVF-a kod kojeg se oocite inseminiraju u *in vitro* uvjetima (Johnson 2019), odnosno dopušta se da spermij samostalno oplodi oocitu. ICSI je predstavljen 1992. godine u svrhu liječenja težih oblika muške neplodnosti. U postupku ICSI se mikromanipulacijom pomoću mikropipeta izabire morfološki uredan spermij te se mehanički injektira u citoplazmu oocite (Palermo i sur. 1992). Cilj postupaka IVF-a je ostvarivanje trudnoće stvaranjem zametaka u *in vitro* uvjetima koji se zatim prenose u materičnu šupljinu (*engl.* embryo transfer; ET). Eventualni višak kvalitetnih zametaka nastalih tijekom IVF postupaka se zamrzava, najčešće metodom vitrifikacije te kriopohranjuje (Nagy i sur. 2020). Kriopohranjeni zamci se čuvaju u specijalnim laboratorijskim posudama, smješteni u tekućem dušiku na -196 °C (Antonouli i sur. 2024)(Slika 1).

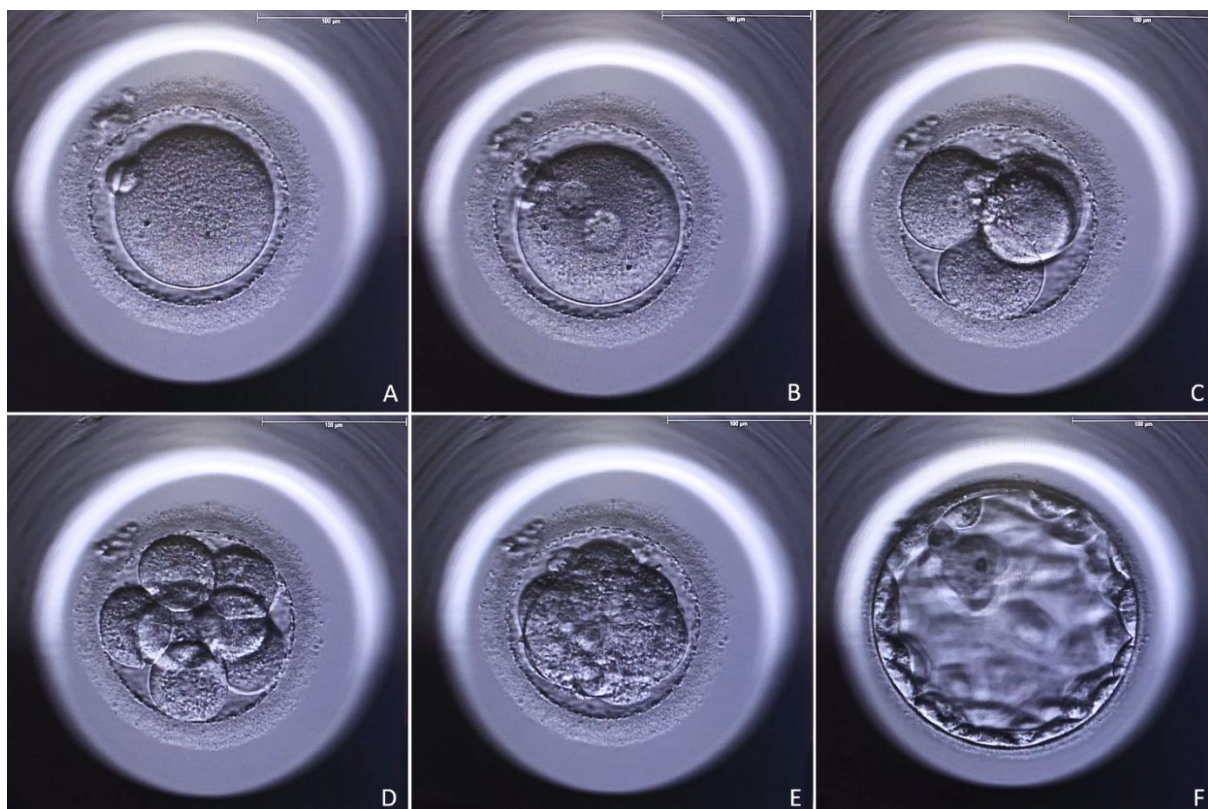


**Slika 1.** Laboratorijska posuda za kriopohranu MVE XC 34/18

Ova praksa omogućuje pacijentima korištenje kriopohranjenih zametaka u kasnijim prijenosima zametaka u materijšte i pokušajima trudnoće, čime se smanjuje potreba za ponovnim IVF postupkom. Ocjenjivanje zametaka na osnovi morfologije i kinetike diobe stanica godinama je primarna metoda odabira zametaka za ET i prijenosa zametaka u materijšte nakon postupka odmrzavanja (engl. frozen embryo transfer; FET), iako stope trudnoće po prenesenom zametku u većini klinika rijetko prelaze 40 %. Temeljem navedenog, mnogi znanstvenici traže dijagnostičke metode koje bi mogle povećati stope uspješnosti IVF postupaka (Ajduk i Zernicka-Goetz 2012).

## **2.2. Procjena kvalitete zametaka**

Procjena razvojnog potencijala IVF zametaka uključuje: procjenu morfologije oocita i zigota te procjenu morfologije i kinetike dioba zametaka 2., 3., 4. te 5. i 6. dana (Slika 2).



**Slika 2.** Uredni razvoj ljudskog zametka od oocite do blastociste: A) oocita u metafazi II, B) zigota u pronuklearnom stadiju – 1. dan razvoja, C) četverostanični zametak – 2. dan razvoja, D) osmostanični zametak – 3. dan razvoja, E) morula – 4. dan razvoja, F) blastocista – 5. dan razvoja

2011. godine postignut je konsenzus o ocjenjivanju zametaka (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011). Blastociste, odnosno zametci 5. i 6. dana ocjenjuju se i standardnim kriterijima na osnovi morfologije i kinetike diobe stanica (Gardner i Schoolcraft 1999).

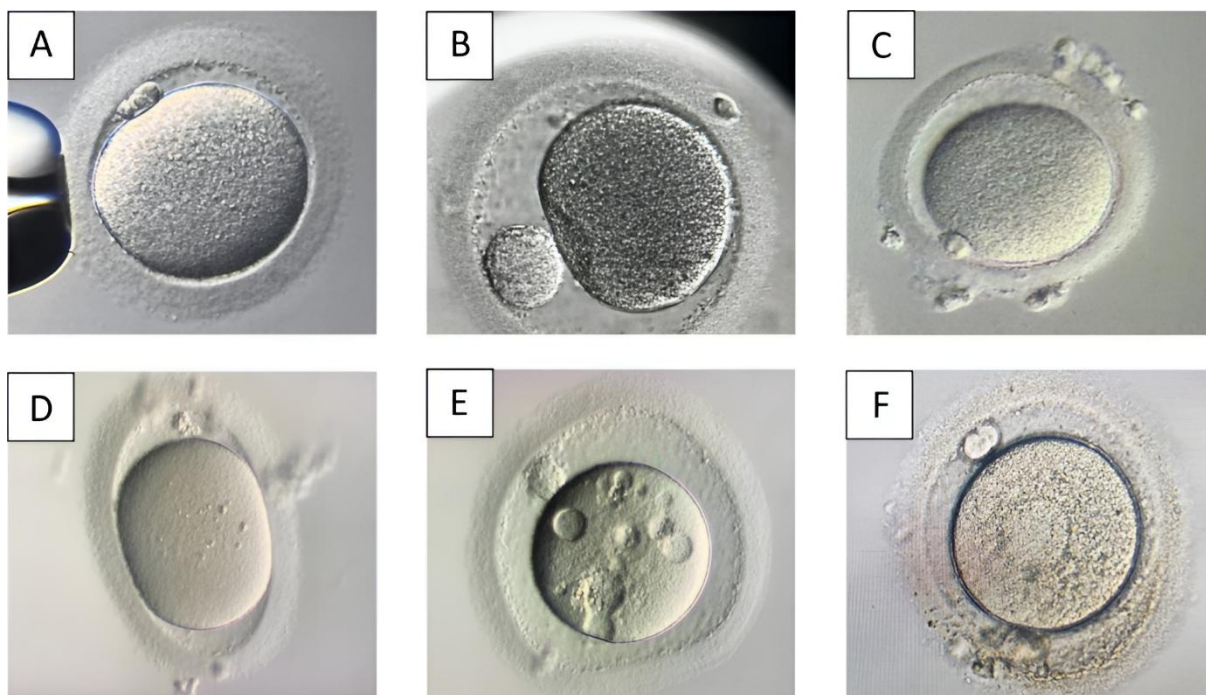
Procjena kvalitete zametaka obavlja se svakodnevno u standardiziranim vremenskim intervalima (Tablica 1). Standardiziranje vremenskih intervala je neophodno za pravilno praćenje razvoja zametaka te se vrijeme procjene zametaka određuje u odnosu na vrijeme IVF inseminacije ili ICSI-ja. Procjenu zametaka vrši klinički embriolog, najčešće na invertnom mikroskopu, iako se u ovu svrhu koristi i pomoć time-lapse inkubatora.

**Tablica 1.** Vrijeme procjene fertilizacije oocita i kvalitete zametaka te očekivani razvojni stadij (preuzeto i prilagođeno iz Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011)

| Vrsta procjene                       | Vrijeme (sati nakon inseminacije) | Očekivani razvojni stadij                                    |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Oplođnja                             | 17 ± 1                            | Pronuklearni stadij                                          |
| Singamija                            | 23 ± 1                            | 50% zigota u singamiji                                       |
| Rana dioba                           | 26 ± 1 nakon ICSI-ja              | 50% zigota u singamiji (20% može biti u 2-staničnom stadiju) |
|                                      | 28 ± 1 nakon IVF-a                |                                                              |
| Procjena kvalitete zametaka - 2. dan | 44 ± 1                            | 4-stanični stadij                                            |
| Procjena kvalitete zametaka - 3. dan | 68 ± 1                            | 8-stanični stadij                                            |
| Procjena kvalitete zametaka - 4. dan | 92 ± 2                            | Morula                                                       |
| Procjena kvalitete zametaka - 5. dan | 116 ± 2                           | Blastocista                                                  |

### 2.2.1. Procjena zrelosti i morfologije oocita

Pri procjeni oocita potrebno je utvrditi zrelost oocite (germinalna vezikula; GV, metafaza I; MI, metafaza II; MII, atrezija; ATR). Optimalna morfologija zrele, MII oocite opisana je sferičnim oblikom koji je obavljen *zonom pellucidom*, s uniformnom, prozirnom citoplazmom bez inkluzija i vakuola te proporcionalno velikim polarnim tjelešcem. Polarno tjelešće je ujedno i indikator zrelosti oocite te njegova pojava označava završetak mejoze I. Perivitelini prostor, odnosno izvanstanični prostor između *zone pellucide* i membrane oocite, ne smije biti preširok (Slika 3). Komplex kumulus-oocita (*engl. cumulus-oocyte complex; COC*) treba biti s raspršenom *coronom radiatom* i raspršenim stanicama kumulusa (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011). Prisutnost COC onemogućuje potpunu morfološku evaluaciju i procjenu zrelosti oocite. Tek kada denudiramo oocitu uz pomoć enzima hijaluronidaze, odnosno nakon mehaničkog čišćenja pipetiranjem, možemo utvrditi morfološke karakteristike i zrelost oocite.



**Slika 3.** Morfološke varijacije MII oocita: A) oocita uredne morfologije, B) oocita s velikim polarnim tijelom i tamnom granuliranom citoplazmom, C) oocita s širokim perivitelinim prostorom, D) oocita ovalnog oblika, E) oocita s citoplazmatskim vakuolama i širokim perivitelinim prostorom, F) oocita s centralnom vakuolom, granuliranom citoplazmom i širokim perivitelinim prostorom (preuzeto i prilagođeno iz Ahmad i sur. 2024)

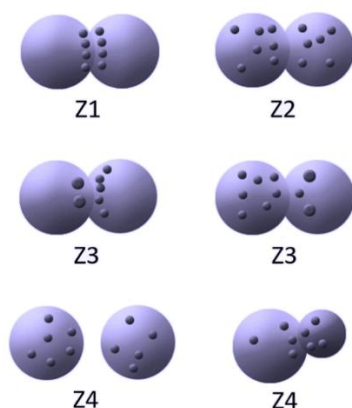
### **2.2.2. Procjena oplodnje (zigota)**

Tijekom provjere oplodnje potrebno je utvrditi postojanje dva pronukleusa i dva polarna tjelešca (Slika 4). Osim navedenog, promatra se broj i smještaj nukleolarnih prekursorskih tjelešaca (*engl.* nucleolar precursor bodies; NPB). Optimalna oplođena oocita trebala bi biti sferična, imati dva polarna tjelešca te dva centralno smještена, međusobno priljubljena pronukleusa jednake veličine s jasno izraženim membranama.



**Slika 4.** Uredno oplođena oocita (2pn) s dva pronukleusa i dva polarna tjelešca – zigota (preuzeto i prilagođeno iz Magli i sur. 2010)

Pronukleusi bi trebali sadržavati jednak broj (5-7) i veličinu NPB-ova, koji su idealno centralno orijentirani i poravnani duž preklapanja membrana. Razmaknuti pronukleusi te pronukleusi i NPB-ovi različite veličine prediktori su lošijeg razvoja zametaka (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011; Scott 2003; Scott i sur. 2000)(Slika 5).



**Slika 5.** Grafički prikaz sustava ocjenjivanja zigote (Z) koji se temelji na broju i raspodjeli nukleolarnih prekursorskih tjelešaca (NPB) unutar pronukleusa (PN). Z1 označava jednak broj NPB-ova (između 3 i 7) centralno orijentiranih i poravnanih duž preklapanja membrana PN-a. Z2 prikazuje nejednak broj NPB-ova iste veličine, raspršenih unutar PN-a. Z3 označava NPB-ove nejednake veličine i brojnosti, jedan PN može imati NPB-ove poravnate duž preklapanja membrana, dok su u drugom NPB-ovi raspršeni. Z4 se definira razmakom između PN-a ili nejednakom veličinom PN-a, pri čemu su NPB-ovi raspršeni unutar PN-a (preuzeto i prilagođeno iz Khalili i sur. 2008)

### **2.2.3. Procjena kvalitete zametaka u staničnom stadiju (2. i 3. dan)**

Promatrani parametri u ocjenjivanju zametaka 2. i 3. dana su staničnost zametaka odnosno broj i veličina blastomera, stupanj fragmentacije te eventualno postojanje multinukleacije (Tablica 2).

U zametke staničnog stadija ubrajamo raspon zametaka od dvostaničnog stadija do zametaka u kojima započinje kompakcija. Istanbulskim konsenzusom (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011) je utvrđeno da je očekivani broj blastomera na drugom danu razvoja od dvije do četiri, dok je za treći dan razvoja očekivani broj blastomera od šest do osam. Zameci kojima je brzina dioba brža ili sporija od očekivane vjerojatno imaju smanjeni implantacijski potencijal. U dvostaničnim, četverostaničnim i osmostaničnim stadijima blastomere trebaju biti jednake veličine, dok se za sve druge staničnosti očekuje razlika u veličini blastomera budući da dioba svih blastomera još nije završena (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).

Fragment se definira kao dio citoplazme koji je okružen staničnom membranom te je manji od 45  $\mu\text{m}$  u dvodnevnim zamecima ili 40  $\mu\text{m}$  u trodnevnim zamecima. Stupanj fragmentacije može biti blagi ( $\leq 10\%$ ), umjereni ( $10 - 25\%$ ) ili teški ( $\geq 25\%$ ). U četverostaničnom zametku stupanj fragmentacije od 25 % odgovara veličini jedne blastomere. Lokalizacija fragmentacije se pri ocjenjivanju ne uzima u obzir budući da je fragmentacija dinamičan fenomen te se fragmenti mogu kretati unutar zametka.

Definicija multinukleacije je prisutnost više od jedne jezgre (nukleusa) u blastomeri, uključujući i mikrojezgre (mikronukleuse). Procjena multinukleacije se vrši kod dvodnevnih zametaka, konsenzusom je određeno da bi određivanje multinukleacije u trodnevnim zamecima bilo otežano zbog manje veličine blastomera i kao takvo ne bi bilo pouzdano. Ukoliko se multinukleacija utvrdi u samo jednoj blastomeri smatra se da zametak ima smanjen implantacijski potencijal. Multinukleacija se povezuje s kromosomskim poremećajima, odnosno povećanim rizikom za spontani pobačaj (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).

**Tablica 2.** Ocjenjivanje staničnih stadija zametaka prema Istanbulskom konsenzusu (preuzeto i prilagođeno iz Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011)

| Ocjena | Opis ocjene                                             |
|--------|---------------------------------------------------------|
| 1      | • <10% fragmentacije (blagi stupanj fragmentacije)      |
|        | • Razvojno-specifična veličina i brojnost blastomera    |
|        | • Bez multinukleacije                                   |
| 2      | • 10-25% fragmentacije (umjereni stupanj fragmentacije) |
|        | • Razvojno-specifična veličina većine blastomera        |
|        | • Bez multinukleacije                                   |
| 3      | • >25% fragmentacije (teški stupanj fragmentacije)      |
|        | • Veličina blastomera nije razvojno-specifična          |
|        | • Postojanje multinukleacije                            |

#### **2.2.4. Procjena kvalitete zametaka u stadiju morule (4. dan)**

Kod četverodnevnih zametaka ocjenjuje se stupanj kompakcije zametka (Tablica 3). Kompakcija zametka može započeti već u osmostaničnom stadiju, a obilježena je nestajanjem jasnih granica između blastomera. Optimalni razvoj zametka u četverodnevnom stadiju karakteriziran je kompakcijom zametka čije stanice prolaze kroz četvrtu staničnu diobu. Kompakcija treba zahvaćati čitavi zametak, a ukoliko je iz kompakcije isključeno više od pola stanica smatra se da zametak ima smanjen reproduktivni potencijal (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011).

**Tablica 3.** Ocjenjivanje staničnih stadija zametaka prema Istanbulskom konsenzusu (preuzeto i prilagođeno iz Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011)

| Ocjena | Opis ocjene                                                               |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1      | • Stanice zametka su započele četvrtu staničnu diobu                      |
|        | • Kompakcija u kojoj je uključen cijeli volumen zametka                   |
| 2      | • Stanice zametka su započele četvrtu staničnu diobu                      |
|        | • Kompakcija u koju je uključen gotovo cijeli volumen zametka             |
| 3      | • Neproporcionalna kompakcija koja zahvaća manje od pola volumena zametka |

### 2.2.5. Procjena kvalitete zametaka u stadiju blastociste (5. i 6. dan)

Između 4. i 5. dana razvoja u moruli započinje akumulacija tekućine između stanica te započinje kavitacija zametka ili proces stvaranja blastocela (središnja šupljina ispunjena tekućinom). Blastocista je definirana trofoektodermom (*engl.* trophectoderm; TE) – slojem vanjskih stanica koje okružuju blastocel te embrioblastom (*engl.* embryoblast ili inner cell mass; ICM) – maloj nakupini stanica koja je okružena trofoektodermom. Iz embrioblasta se kasnije formira fetus, dok od trofoektoderma nastaje posteljica. Širenjem blastocela uz istovremenu diobu stanica rana blastocista se ekspandira (*engl.* expansion), *zona pellucida* se istanjuje te se blastocisti povećava volumen. Napredovanjem staničnih dioba i povećanjem volumena blastocela dolazi do daljnje ekspanzije blastociste. Posljedično, *zona pellucida* se istanjuje do kritične razine i na kraju puca te omogućuje izlijevanje (*engl.* hatching) blastociste koja se na kraju u potpunosti oslobađa *zone pellucide*.

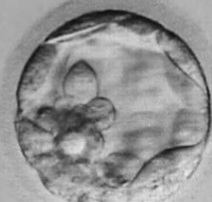
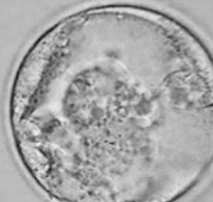
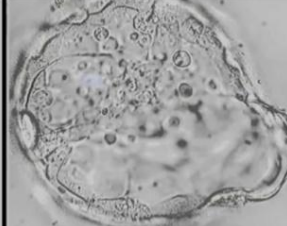
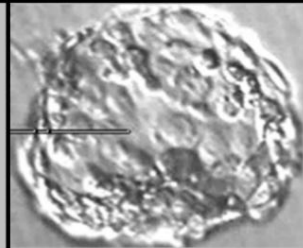
Pri ocjenjivanju blastociste uzimamo u obzir stupanj ekspanzije blastociste te staničnost i kvalitetu embrioblasta i trofoektoderma (Slika 6).

Stupanj ekspanzije blastocista se obilježava brojevima od 1 do 6. Stupanj ekspanzije 1 odgovara ranoj blastocisti, u kojoj blastocel zauzima manje od pola volumena blastociste. Stupanj ekspanzije 2 karakterizira blastocel koji zauzima pola ili više od pola volumena blastociste. U stupnju ekspanzije 3 blastocel zauzima većinu volumena blastociste, ali blastocista ima mogućnost daljnje ekspanzije te se *zona pellucida* može dodatno stanjiti. Stupanj ekspanzije 4 odgovara ekspandiranoj odnosno potpuno ekspandiranoj blastocisti u kojoj je blastocel većeg volumena od ishodišnog volumena zametka te se *zona pellucida*

istanjuje do kritične razine. U stupnju ekspanzije 5 započela je hernijacija trofoektoderma i embrioblasta kroz pukotinu *zone pellucide*, odnosno blastocista je u procesu izlijeganja. U stupnju ekspanzije 6, blastocista se u potpunosti izlegla i odvojila od *zone pellucide*.

Kvaliteta embrioblasta se ocjenjuje sa A, B ili C. Ocjenom A opisujemo visokokvalitetan embrioblast koji je izgrađen od brojnih gusto zbijenih stanica koje čine jasno definiranu čvorastu strukturu. Ocjenom B se opisuje embrioblast koji ima manje stanica, stanice izgrađuju manju čvorastu strukturu te su slabije povezane. Kod ocjene C embrioblast je niske kvalitete, loše definiran i izgrađen od malog broja slabo povezanih stanica.

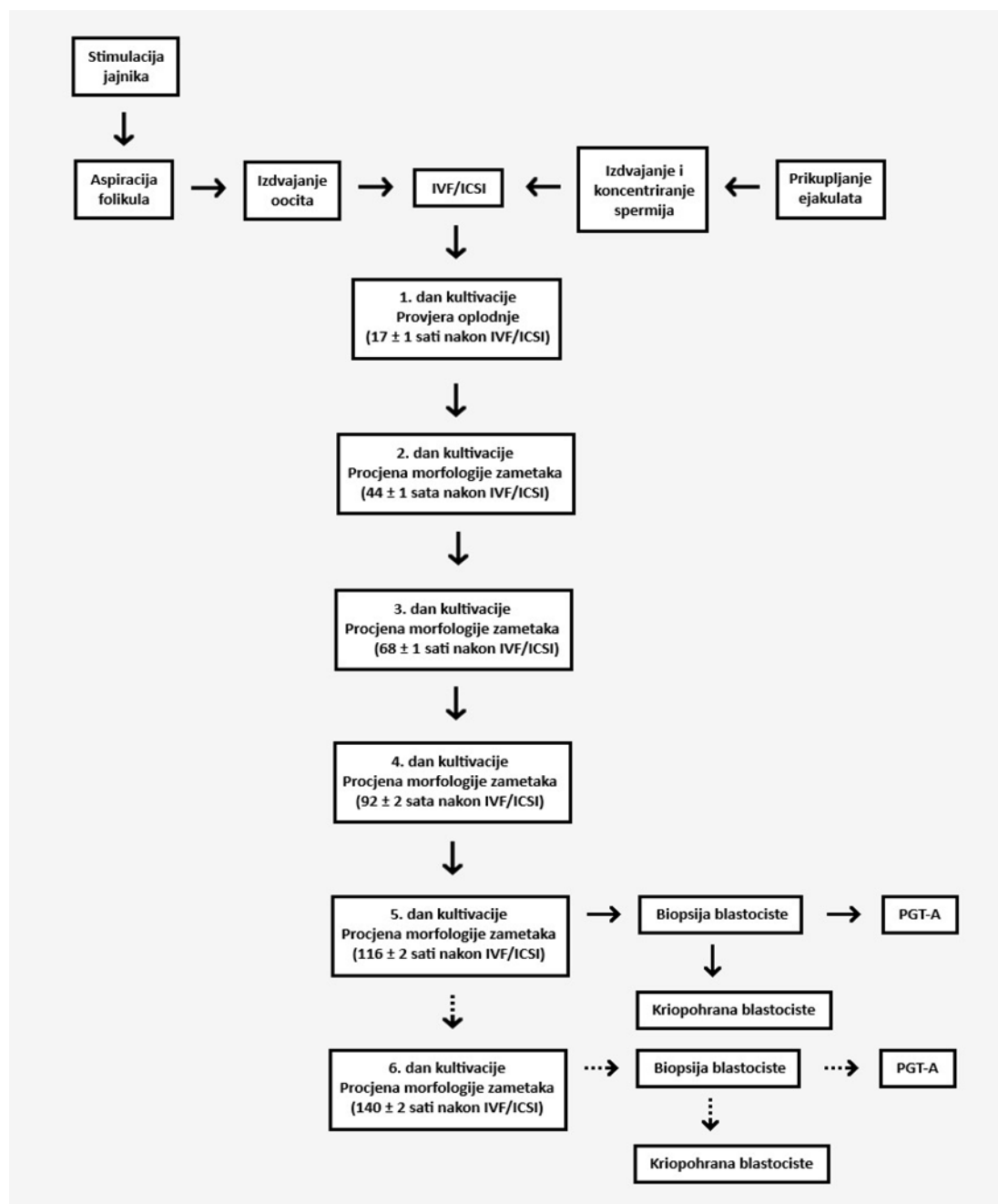
Kvaliteta trofoektoderma se također ocjenjuje sa A, B i C. Ocjenom A opisujemo visokokvalitetan trofoektoderm koji je izgrađen od mnogobrojnih, zbijenih stanica, uniformne veličine koje formiraju pravilno raspoređeni kohezivni epitel. Ocjena B odgovara trofoektodermu koji je izgrađen od manjeg broja slabije povezanih stanica koje imaju manju razinu uniformnosti te formiraju nepravilnije raspoređen epitel. Kod ocjene C trofoektoderm je niske kvalitete, izgrađen je od malobrojnih stanica nejednake veličine koje su slabo povezane u epitel koji je često prožet prazninama (Gardner i Schoolcraft 1999).

|                                        |                                                                                     |                                                                                      |                                                                                       |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Embrioblast                            | A                                                                                   | B                                                                                    | C                                                                                     |
| Trofoektoderm                          | A                                                                                   | B                                                                                    | C                                                                                     |
| Morula                                 |   |                                                                                      |                                                                                       |
| Stupanj ekspanzije blastociste         |                                                                                     |                                                                                      |                                                                                       |
| 1<br>Rana Blastocista                  |    |     |    |
| 2,3<br>Blastocista                     |   |    |   |
| 4<br>Ekspandirana Blastocista          |  |   |  |
| 5<br>Blastocista u procesu izlijeganja |  |   |  |
| 6<br>Izlegnuta Blastocista             |  |  |  |

**Slika 6.** Blastociste sa različitim stupnjem ekspanzije blastocela i različitom ocjenom kvalitete embrioblasta i trofoektoderma (preuzeto i prilagođeno iz Kirkegaard 2023)

### 2.3. Biopsija zametaka i predimplantacijsko genetičko testiranje

Tijekom postupka MPO, danas je moguće učiniti biopsiju zametaka te detaljno analizirati genetski odnosno razvojni potencijal zametka sa sve većom preciznošću (Cimadomo i sur. 2020). Nakon biopsije zametaka, zameci se individualno kriopohranjuju te ostaju kriopohranjeni do rezultata genetičkih analiza odnosno do FET-a (Healy i sur. 2010; Ishihara i sur. 2011) (Slika 7).



**Slika 7.** Shematski prikaz postupka medicinski potpomognute oplodnje s biopsijom i predimplantacijskim genetičkim testiranjem u stadiju blastociste

Prema podacima ESHRE-a (*engl.* European Society for Reproductive Medicine) i ASRM-a (*engl.* American Society for Reproductive Medicine), najčešće korištena tehnologija pri izvođenju biopsija zametaka je laserski potpomognuto otvaranje *zone pellucide* (Moutou i sur. 2014). Tijekom postupka, uz pomoć invertnog mikroskopa s ugrađenim laserom i sustavom za mikromanipulaciju, *zona pellucida* se otvara pulsirajućim laserskim zrakama snage od 20 do 400 mW. Nastali otvor omogućava pristup stanicama zametka kako bi se mogli uzeti uzorci za analizu.

Predimplantacijsko genetičko testiranje (*engl.* preimplantation genetic testing; PGT) je revolucionarna tehnologija koja je razvijena sinergijskim napretkom IVF-a i genetike. PGT omogućuje odabir i prijenos zdravih IVF zametaka u materiče, smanjujući rizik aneuploidije i genetskih bolesti. Glavne dijagnostičke mogućnosti PGT-a su predimplantacijsko genetičko testiranje monogenetskih bolesti (*engl.* preimplantation genetic testing for monogenic disorders; PGT-M) i PGT-A. Svrha PGT-M je otkrivanje nasljednih mutacija na razini gena i sprječavanje prijenosa nasljednih monogenetskih bolesti na potomstvo (Giuliano i sur. 2023). PGT-A je metoda kojom se analiziraju i procjenjuju 23 para kromosoma iz bioptiranih stanica, odnosno metoda kojom se identificiraju kromosomski poremećaji u zamecima. Svrha PGT-A je smanjenje aneuploidnih trudnoća kod pacijentica koje prolaze kroz IVF postupak.

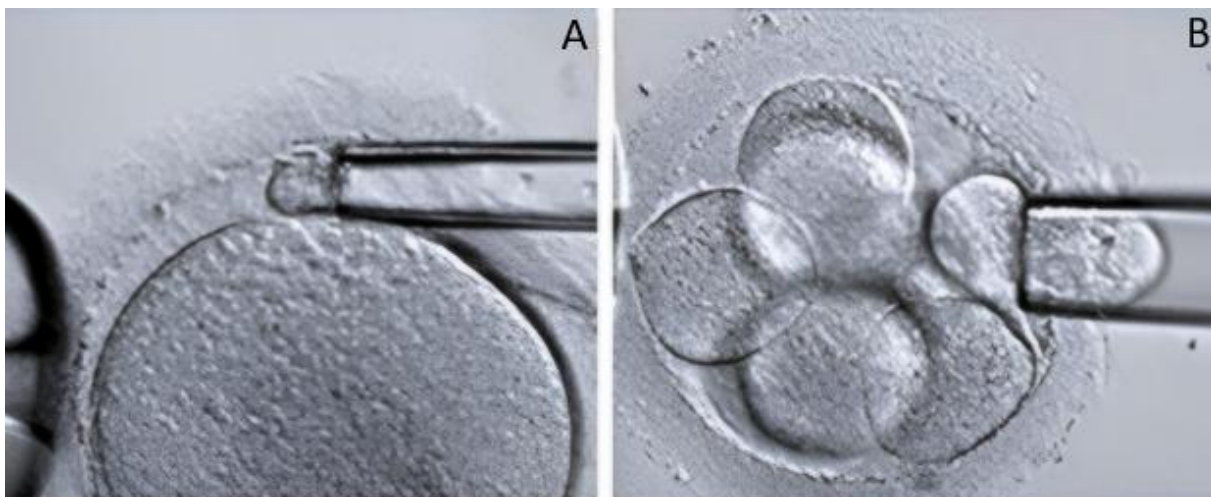
### **2.3.1. Pristupi biopsiji zametaka tijekom IVF postupka**

Postoje tri različita pristupa biopsiji u IVF-u: biopsija polarnog tjelešca (*engl.* polar body biopsy), biopsija blastomera (zametak u staničnom stadiju, treći dan razvoja, *engl.* cleavage-stage biopsy) i biopsija trofoektoderma (blastociste petog ili šestog dana razvoja, *engl.* blastocyst biopsy).

Biopsija polarnog tjelešca razlikuje se od biopsija u staničnom stadiju i stadiju blastociste jer se njom ne bioptiraju diploidne embrionalne stanice već polarna tjelešca (Slika 8A). Polarna tjelešca su haploidne stanice s malim citoplazmatskim volumenom koje nastaju tijekom oogeneze. Biopsija polarnog tjelešca je prva metoda koja se koristila pri analizi genetskog potencijala oocita i IVF zametaka. Inicijalna primjena metode bila je pri identifikaciji predisponirajućih alela (*engl.* susceptibility allele) u oocitama žena koje su heterozigotne, odnosno nositeljice različitih tipova nasljednih poremećaja. Polarna tjelešca su nusproizvodi mejoze I i II te se mogu bioptirati jedno po jedno ili istovremeno

nakon oplodnje. Prednosti biopsije polarnog tjelešca su manja invazivnost u usporedbi s drugim pristupima IVF biopsija te širi vremenski okvir za analizu genetskog materijala prilikom svježih prijenosa zametaka u materijšte. Nedostaci leže u činjenici da se polarna tjelešca ne mogu koristiti za evaluaciju očinskih kromosoma ili mitotski vezanih aneuploidija te je biopsija polarnih tjelešaca ograničena na detekciju mejotskih nepravilnosti i strukturnih razmještanja majčinog podrijetla. Također, zbog mogućnosti brze fragmentacije polarnog tjelešca, odgoda u biopsiji može rezultirati pogrešnom dijagnozom ili nedostatkom rezultata (Griffin i Harton 2020; Montag i sur. 2013).

Biopsija blastomera u staničnom stadiju zametka izvodi se kod trodnevničkih zametaka koji imaju najmanje šest blastomera. Nakon otvaranja *zone pellucide*, biopsijom se izdvajaju jedna ili dvije blastomere (Slika 8B), koje, ukoliko se pokažu aneuploidnim, klasificiraju cijeli zametak kao aneuploidan. Tijekom staničnog razvoja, primijećene su visoke stope mozaicizma ploidije među blastomerama istog zametka te rezultati genetske analize jedne ili dvije blastomere često odstupaju od realne ploidije zametka (Cimadomo i sur. 2016; Esfandiari i sur. 2016). Uzastopnim biopsijama zametaka dokazano je znatno odstupanje u ploidiji trodnevničkih zametaka i zametaka u stadiju blastociste te je samo kod 23 % analiziranih zametaka ustanovljena identična ploidija u oba razvojna stadija (Rabinowitz i sur. 2011). Nadalje, bioptiranjem jedne blastomere osmostaničnog zametaka uklanja se 12,5 % ukupnog genetskog materijala zametka, dok se pri biopsiji dvije blastomere uklanja čak 25 %. Zbog nepovoljnih utjecaja biopsije blastomera na daljnji razvoj zametka te značajnog smanjenja reproduktivnog potencijala i stope implantacije u usporedbi sa biopsijama trofoektoderma ili prijenosima ne-bioptiranih zametaka (Scott i sur. 2013) sve više laboratorija izbjegava biopsije trodnevničkih zametaka i isključivo izvode biopsije u stadiju blastociste (Takeuchi 2020).



**Slika 8.** A) Biopsija polarnog tjelešca i B) Biopsija blastomere osmostaničnog zametka (preuzeto i prilagođeno iz Greco i sur. 2015)

Biopsija stanica trofoektoderma provodi se kod blastocista petog ili šestog dana razvoja, iako se u iznimnim slučajevima, kod spororastućih zametaka, može učiniti i u sedmom danu razvoja. Tijekom biopsije potpomognute laserom 5-10 stanica trofoektoderma se odvaja od blastociste, odnosno bioptira uz pomoć mikropipeta i pulsirajućih laserskih zraka (Aoyama i Kato 2020; Hernández i sur. 2018).

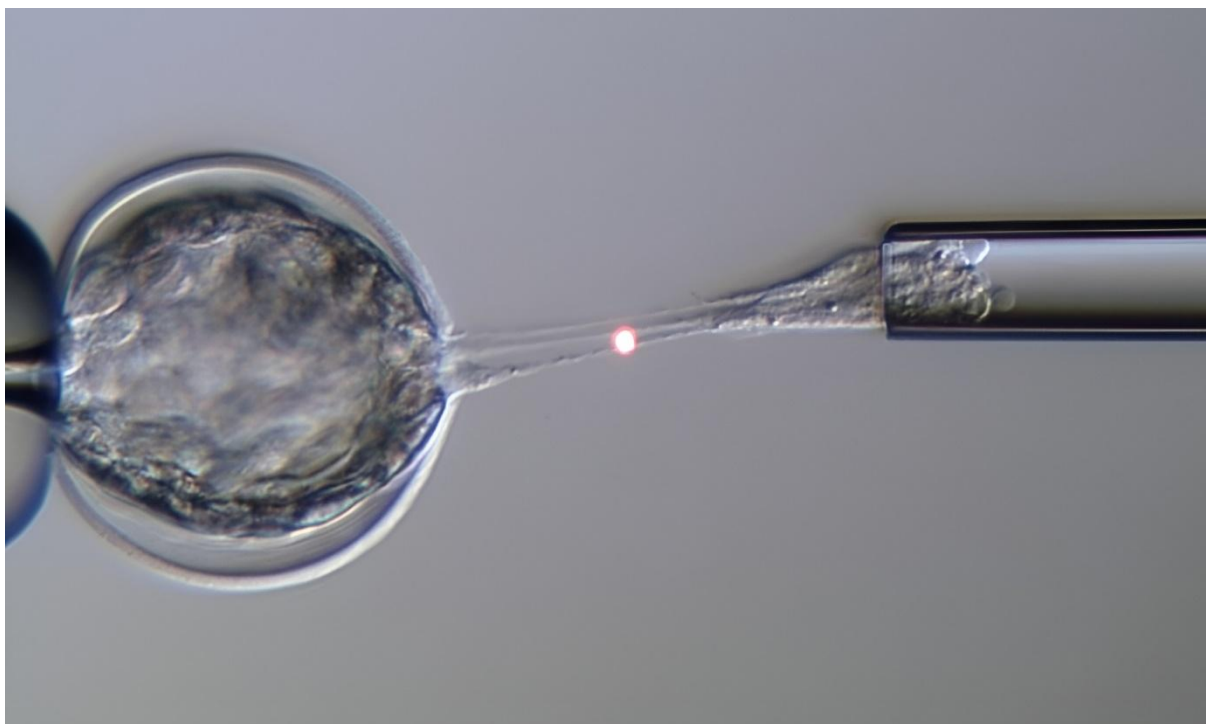
Postoje dva osnovna pristupa biopsiji blastociste potpomognutoj laserom. Pri prvom pristupu *zona pellucida* se otvara pulsirajućim laserskim zrakama (*engl.* laser assisted hatching; LAH) u 3., 4., 5., ili 6., danu razvoja zametka te se zametak nastavlja kultivirati do početka izlijevanja blastociste. Nastali otvor u *zoni pellucidi* rezultira prijevremenim izlijevanjem blastociste te omogućava kliničkom embriologu lakši pristup stanicama trofoektoderma (Slika 9). Negativna strana LAH pristupa tijekom 3. ili 4. dana razvoja je mogućnost početka izlijevanja blastociste stanicama embrioblasta. Ukoliko izlijevanje, odnosno hernijacija započne od embrioblasta, postoji mogućnost oštećenja ili gubitka embrioblasta tijekom biopsije što uvelike može smanjiti reproduktivni potencijal zametka. Tijekom ranijih stadija blastociste, lokacija embrioblasta unutar blastociste postaje vidljiva te se *zona pellucida* otvara nasuprot embrioblasta. Navedeno otklanja rizik početka hernijacije embrioblastom i osigurava početak hernijacije trofoektodermom (Aoyama i Kato 2020).



**Slika 9.** Biopsija stanica trofoektoderma blastociste nakon LAH-a. *Zona pellucida* nije istanjena te su stanice blastociste malobrojnije i veće jer otvor nastao LAH-om omogućuje prijevremeno izlijevanje blastociste (preuzeto i prilagođeno iz Dickson i sur. 2024)

Drugi pristup ne koristi LAH te se biopsija provodi od stadija ekspanzirane blastociste do stadija blastociste u procesu izlijevanja. Kod ekspanzirane blastociste *zona pellucida* se otvara neposredno prije biopsije pomoću pulsirajućih laserskih zraka nasuprot embrioblasta, a nastali otvor omogućuje pristup stanicama trofoektoderma koje se zatim bioptiraju (Slika 10). Kod blastociste u procesu izlijevanja bioptiraju se prirodno izlegnute stanice trofoektoderma. Tijekom prirodnog izlijevanja blastociste također postoji rizik početka izlijevanja stanicama embrioblasta, što uvelike može otežati biopsiju. Prednost pristupa biopsije u stadiju ekspanzirane blastociste ili blastociste u procesu izlijevanja nad LAH pristupom je veća brojnost stanica blastociste u trenutku biopsije. LAH pristup uvjetuje prijevremeno izlijevanje, odnosno izlijevanje u ranijim stadijima razvoja blastociste. Raniji stadiji blastocista često sadrže manji broj stanica u odnosu na kasnije stadije, odnosno ekspanzirane blastociste i blastociste u procesu izlijevanja. Omjer broja bioptiranih stanica i ukupnog broja stanica poistovjećuje se sa stupnjem invazivnosti biopsije, dok biopsija blastocista u kasnijim stadijima, kada blastociste imaju veću staničnost može smanjiti invazivnost biopsije. Nadalje, kultivacija do kasnijih stadija

može imati dodatne prednosti pri procjeni morfološke ocjene blastociste (Aoyama i Kato 2020; Iwasawa i sur. 2019).



**Slika 10.** Biopsija stanica trofoektoderma ekspanzirane blastociste potpomognuta laserom, *zona pellucida* je istanjena povećanjem volumena blastocela i povećanjem brojnosti stanica trofoektoderma. Crvenkasti odsjaj predstavlja lasersku zraku (preuzeto i prilagođeno od Embryotools 2025)

Izdvajanje više stanica iz područja trofoektoderma u stadiju blastociste, rezultira značajno preciznijim rezultatima genetičkih testiranja u odnosu na ostale biopsije zametaka te su biopsije blastocista postale zlatni standard u laboratorijima diljem svijeta. Istraživanja ukazuju da biopsija blastociste potpomognuta laserom nema negativan utjecaj na daljnji razvoj zametka, kao i kasniji rast fetusa te da ne utječe na težinu novorođenčeta (Eldar-Geva i sur. 2014; Esfandiari i sur. 2016; Scott i sur. 2013; Taylor i sur. 2010).

### **2.3.2. Predimplantacijsko genetičko testiranje za aneuploidiju**

PGT-A metodom otkrivaju se euploidni zamci, koji će rezultirati višim stopama trudnoća te smanjenim stopama pobačaja nakon prijenosa zametaka stvorenih IVF postupcima. U svrhu utvrđivanja ploidnosti zametka koriste se različite molekularno biološke metode: fluorescentna *in situ* hibridizacija (*engl.* fluorescence in situ hybridization; FISH), komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (*engl.* array CGH; aCGH), jednonukleotidni polimorfizmi na mikropostroju (*engl.* single-nucleotide polymorphism microarray; SNP microarray), kvantitativna lančana reakcija polimerazom (*engl.* quantitative polymerase chain reaction; qPCR) i NGS. Od navedenih, metoda NGS PGT-A postaje sve zastupljenija zbog svoje osjetljivosti, preciznosti i brzine (Brezina i sur. 2013; Brezina i sur. 2016).

NGS tehnologija obuhvaća sljedeće korake: priprema DNA knjižnice (stvaranje ili kreiranje fragmenata za sekvenciranje), imobilizacija fragmenata knjižnice na solidnu fazu, umnožavanje fragmenata, masivno paralelno sekvenciranje fragmenata i bioinformatičku analizu rezultata. pristupi sekvenciranja kratkih očitavanja (*engl.* short-read sequencing) podijeljeni su u dvije kategorije: sekvenciranje ligacijom (*engl.* sequencing by ligation; SBL) i sekvenciranje sintezom (*engl.* sequencing by synthesis; SBS). Kod SBL pristupa, sekvencija probe vezane za fluorofor najprije se hibridizira s DNA fragmentom te zatim ligira za susjedni oligonukleotid da bi se omogućio postupak skeniranja. Emisijski spektar fluorofora otkriva vrstu baze ili više baza komplementarnih specifičnim pozicijama unutar probe. Kod SBS pristupa primjenjuje se polimeraza i signal (poput fluorofora ili promjene u koncentraciji iona) koji prepoznaje dodavanje nukleotida u lanac koji se produžuje (elongira). U većini SBL i SBS pristupa klonsko amplificiranje DNA izvodi se na čvrstoj podlozi. Nekoliko tisuća kopija fragmenata smještenih na točno određenim mjestima osigurava emitiranje ili proizvodnju dovoljno jakog signala koji se može jasno razlikovati od pozadinskog šuma (Štimac i Martinković 2021).

Od 2013. godine, nakon prve uspješne primjene NGS tehnologije pri odabiru IVF zametaka, brojna istraživanja ukazuju na učinkovitost i pouzdanost NGS-a. Visoka osjetljivost NGS PGT-A omogućuje detekciju 98 % genetskih poremećaja koje pronalazimo kod ljudi te je metoda do 100 % osjetljiva i specifična pri detekciji numeričkih kromosomskih aberacija (*engl.* whole chromosome aneuploidy) i strukturnih

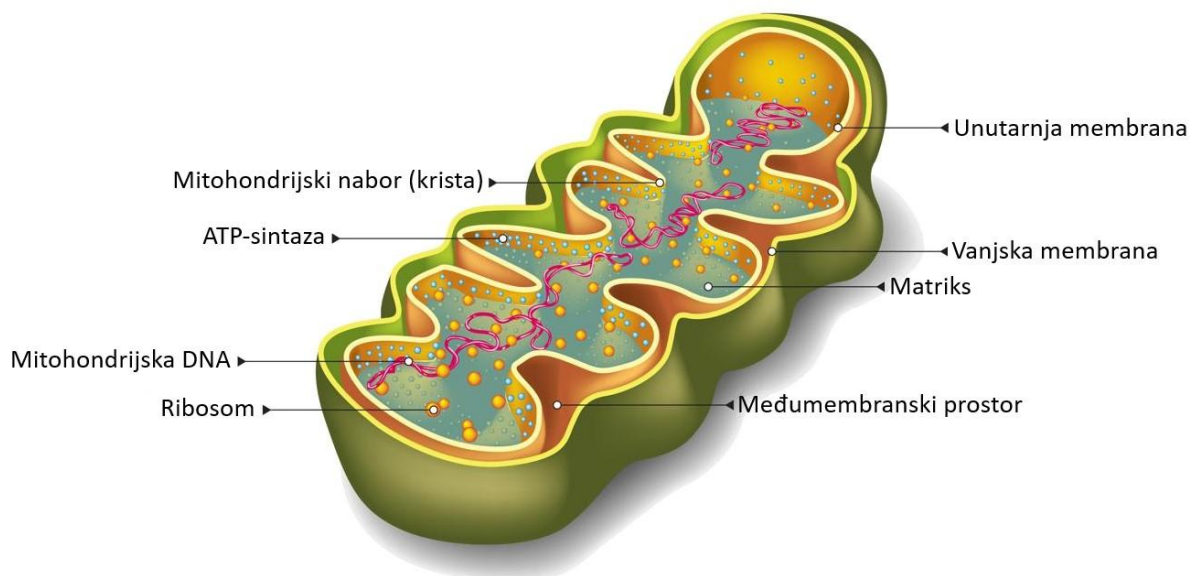
poremećaja kromosoma (*engl.* segmental aneuploidy) (García-Pascual i sur. 2020). U usporedbi s ostalim, često korištenim metodama PGT-A (aCGH, SNP microarray), NGS PGT-A ima mogućnost prepoznavanja manjih kromosomskih poremećaja, mozaičnih oblika i parcijalnih aneuploidija. Posljedično, prijenosi zametaka analiziranih NGS PGT-A imaju značajno više stope urednih trudnoća te trudnoće rezultiraju višim stopama rođenja zdrave novorođenčadi (Alyafee i sur. 2021; Friedenthal i sur. 2016; Russo i sur. 2014).

Unatoč tome što je poznato da su kromosomski poremećaji vodeći uzrok neuspješnog ishoda ET odnosno ranog gubitka trudnoće, treba istaknuti da 40-50 % prijenosa euploidnih zametaka u stadiju blastociste isto tako ne rezultira ostvarenim trudnoćama (Kim i sur. 2010; Yang i sur. 2016). Navedeno upućuje da euploidija sama po sebi ne uvjetuje vijabilnost zametka (Luo i sur. 2023) te znanstvenici još uvijek traže nove pristupe koji bi povećali uspješnost IVF postupaka. Uz analizu ploidnosti, PGT-A omogućuje i kvantifikaciju mtDNA zametka, čime mtDNA postaje mogući dodatni biomarker tijekom IVF postupka.

## **2.4. Mitohondriji i mitohondrijska DNA**

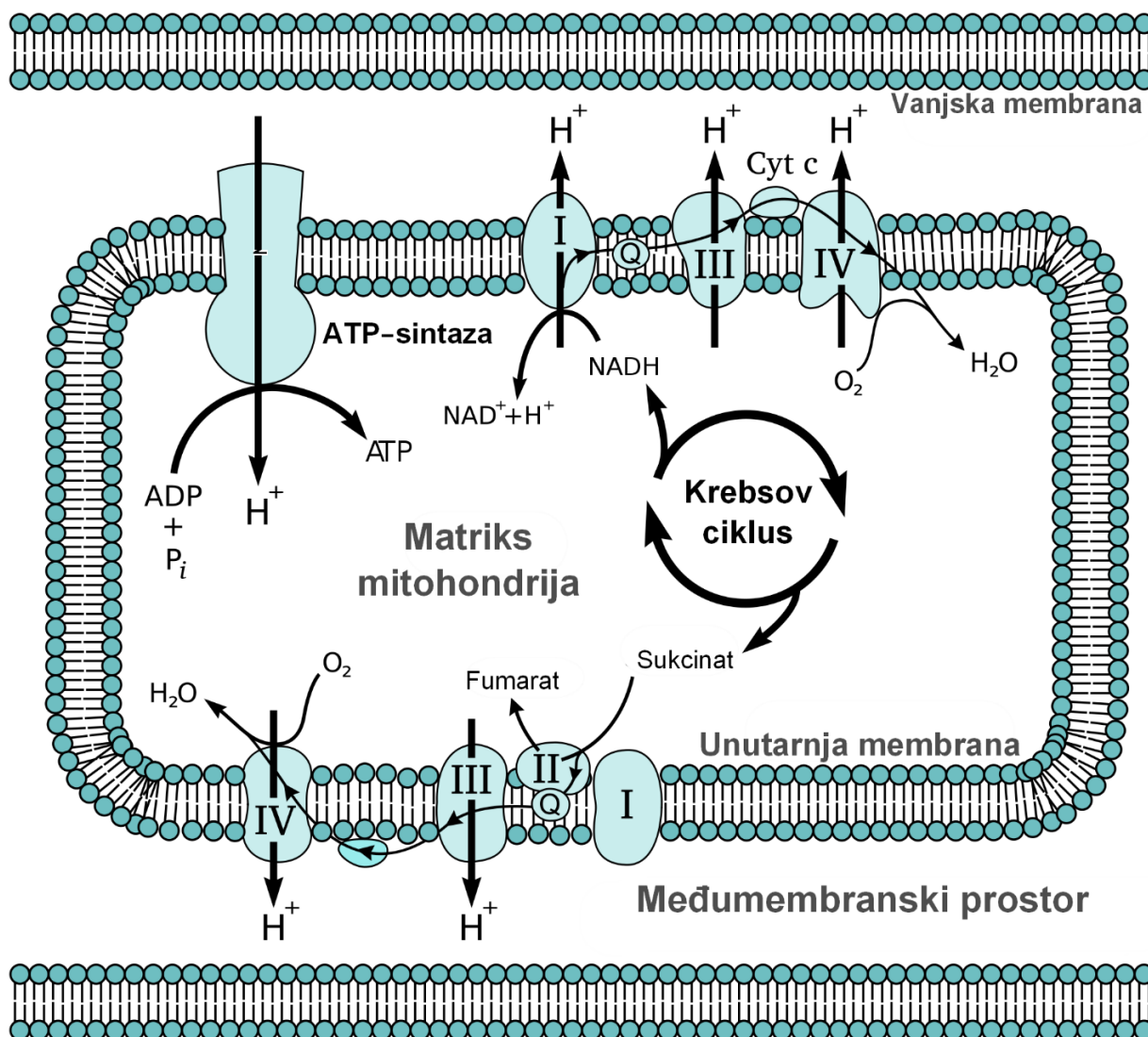
### **2.4.1. Struktura i funkcija mitohondrija**

Mitohondriji su stanični organeli koji reguliraju različite složene stanične procese i služe kao generatori energije u gotovo svim eukariotskim stanicama. Procesom oksidativne fosforilacije generiraju energiju u obliku ATP-a, koji je ujedno primarni izvor stanične energije. Mitohondriji su sferičnog oblika i omeđeni su dvjema membranama, unutarnjom i vanjskom membranom. Vanjska membrana sadrži transmembranske proteine porine koji omogućuju prolaz molekulama manjim od 5 kilodaltona (kDa) te veće multiproteinske translokazne komplekse koji prepoznaju signalne sekvence na većim proteinima i omogućuju im prolazak. Unutarnja membrana je prožeta kristama, odnosno naborima membrane koja povećavaju njenu površinu te sadrži sve komponente potrebne za lanac prijenosa elektrona i sintezu ATP-a. Između vanjske i unutarnje membrane nalazi se međumembranski prostor, dok se unutar unutarnje membrane nalazi matriks mitohondrija (Chial i Craig 2008; Podolak i sur. 2022) (Slika 11).



**Slika 11.** Grafički prikaz strukture mitohondrija (preuzeto i prilagođeno od CORDIS 2016)

U usporedbi sa citoplazmom stanice, matriks mitohondrija je više viskozan te sadrži mtDNA, ribosome, enzime, male organske molekule, nukleotidne kofaktore i anorganske ione. Enzimi matriksa omogućuju reakcije potrebne za proizvodnju ATP-a: Krebsov ciklus odnosno ciklus limunske kiseline, oksidativnu fosforilaciju, oksidaciju piruvata i beta-oksidaciju masnih kiselina (Voet i sur. 2013) (Slika 12).



**Slika 12.** Grafički prikaz oksidativne fosforilacije (preuzeto i prilagođeno od Fvasconcellos 2007)

Ovisno o veličini i energetske potrebe, stanice se uvelike razlikuju u odnosu na ukupan broj mitohondrija i količini mtDNA. Somatske stanice sisavaca imaju široki raspon broja mitohondrija po stanici, od ~80 pa do ~2000 (Cole 2016). Mitohondriji somatskih stanica u prosjeku sadržavaju od 5 do 10 kopija mtDNA (He i sur. 2010; Zhang i sur. 2015).

Regulacija funkcije mitohondrija ostvaruje se pomoću specifičnih mitohondrijskih transkripcijskih čimbenika kodiranih u nDNA i dostupnošću prekursora adenosin-difosfata (*engl.* adenosine diphosphate; ADP) i NADPH-a (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH), supstrata nužnih za sintezu ATP-a. S padom razine NADPH-a, proizvodi se manje ATP-a. Na taj se način funkcija mitohondrija usklađuje s

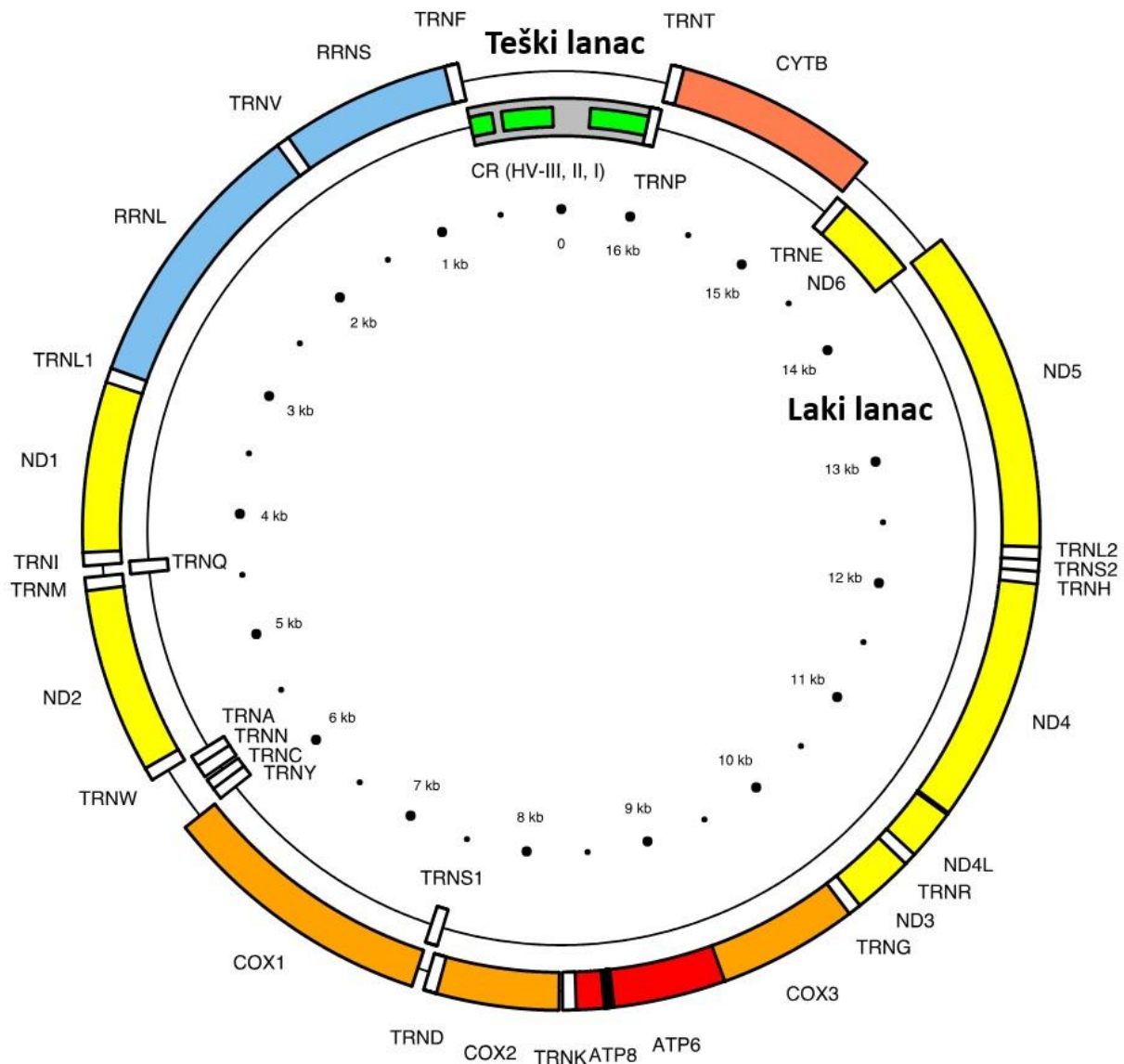
dostupnošću supstrata, i vrlo specifičnom međusobnom komunikacijom između mitohondrijskog i jezgrinog genoma (Chappel 2013).

Osim sinteze ATP-a, mitohondriji reguliraju široki spektar metaboličkih procesa i signalnih puteva u stanicama, uključeni su u sintezu kisikovih slobodnih radikala (*engl.* reactive oxygen species; ROS) (Li i sur. 2013),  $\text{Ca}^{2+}$  homeostazu odnosno  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaciju, termogenezu (Kuznetsov i sur. 2016), regulaciju proliferacije, programiranu staničnu smrt (Antico Arciuch i sur. 2012), regulaciju staničnog metabolizma (Rossi i sur. 2019), sintezu hema (Oh-hama 1997), sintezu steroida (Rossier 2006), hormonsku i imunološku signalizaciju (Breda i sur. 2019; Klinge 2008).

#### **2.4.2. Mitohondrijska DNA**

Pretpostavlja se da evolucijski korijeni mitohondrija sežu dvije milijarde godina u prošlost, kada je  $\alpha$ -proteobakterija fuzionirala s prekursorom eukariotske stanice (Lane i Martin 2010). Iako su mitohondriji zadržali dvomembranski karakter svojih predaka, njihov oblik i ustroj se drastično izmijenio te su s vremenom stekli mnoštvo funkcija važnih za život eukariotskih stanica. U procesu stjecanja novih funkcija tijekom evolucije, većina genskog materijala  $\alpha$ -proteobakterije se ili izgubila ili prenijela u jezgrinu DNA (Gabaldón i Huynen 2004). Genetski materijal koji je preostao u matriksu mitohondrija je današnja mtDNA.

Ljudska mtDNA je prvi značajniji dio ljudskog genoma koji je u potpunosti sekvenciran. Ona je kružna dvolančana molekula koja je sastavljena od 16,569 baznih parova (bp). Kodira 13 proteina, 22 transportne RNA (tRNA) i 2 ribosomalne DNA (rRNA). Lanci mtDNA nazivaju se teški lanac (*engl.* heavy strand; H-strand) i laki lanac (*engl.* light strand; L-strand). Teški lanac je bogat guaninom i kodira 12 proteina, 2 rRNA (12S i 16S) i 14 tRNA. Laki lanac je bogat citozinom i kodira 1 protein i 8 tRNA (Anderson i sur. 1981) (Slika 13). Mitohondrijski genom je osjetljiviji na oksidativna oštećenja i podložniji je većoj stopi mutacija u usporedbi s nDNA (Zhang i sur. 2015).



**Slika 13.** Grafički prikaz genoma ljudske mitohondrijske DNA (preuzeto i prilagođeno iz Letchuman 2018)

MtDNA nije gola molekula već je pakirana u veće nukleoproteinske komplekse koje se nazivaju nukleoidi. Promjer nukleoida je približno 100 nm te uključuje jednu ili više molekula mtDNA po nukleoidu. Proteini koji vežu DNA u nukleoidu uključeni su u održavanje i transkripciju mitohondrijskog genoma te u druge funkcije kao što su regulacija mitohondrijskog metabolizma, biogeneze, apoptoze i retrogradne mitohondrij-jezgra signalizacije. Glavna strukturna proteinska komponenta nukleoida je protein-mitohondrijski transkripcijski faktor A (*engl.* mitochondrial transcription factor A; TFAM), koji je prisutan u omjeru 1 podjedinica TFAM po 16-17 bp mtDNA (Falkenberg 2018; Gilkerson i sur. 2013).

Replikacija mtDNA odvija se pomoću mitohondrijske DNA polimeraze  $\gamma$  (pol  $\gamma$ ), mtDNA helikaze (TWINKLE) i mtSSB proteina (*engl.* mitochondrial single-stranded DNA-binding protein). TWINKLE odmotava kratke dsDNA u smjeru od 5'-3' te je stimulirana mtSSB proteinom koji pospješuje odmotavanje lanaca (Sen i sur. 2012). DNA polimeraza  $\gamma$  je heterotrimer koji se sastoji od katalitičke podjedinice pol  $\gamma$ A mase 139 kDa kodirane POLG genom i dvije podjedinice pol  $\gamma$ B mase 53 kDa kodirane POLG2 genom. Pol  $\gamma$ A spada u obitelj A DNA-polimeraza i posjeduje odvojene domene sa polimeraznom i 3'-5' egzonukleaznom aktivnošću, dok pol  $\gamma$ B pospješuje vezanje DNA, stimulira polimeraznu i egzonukleaznu aktivnost te stimulira sintezu DNA (Yakubovskaya i sur. 2006). DNA-usmjerena RNA polimeraza (*engl.* DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial; POLRMT) je odgovorna za stvaranje RNA početnica odnosno za inicijaciju replikacije mitohondrijskog genoma. Nakon replikacije mtDNA, sestrinske molekule su mehanički povezane kao katenani, odnosno hemikatenani – dvolančane molekule DNA zajedno povezane jednolačanom vezom. Za odvajanje sestrinskih molekula mtDNA potrebna je dekatencija za koju je zadužen enzim topoizomeraza 3 $\alpha$  (Top3 $\alpha$ ) (Falkenberg 2018).

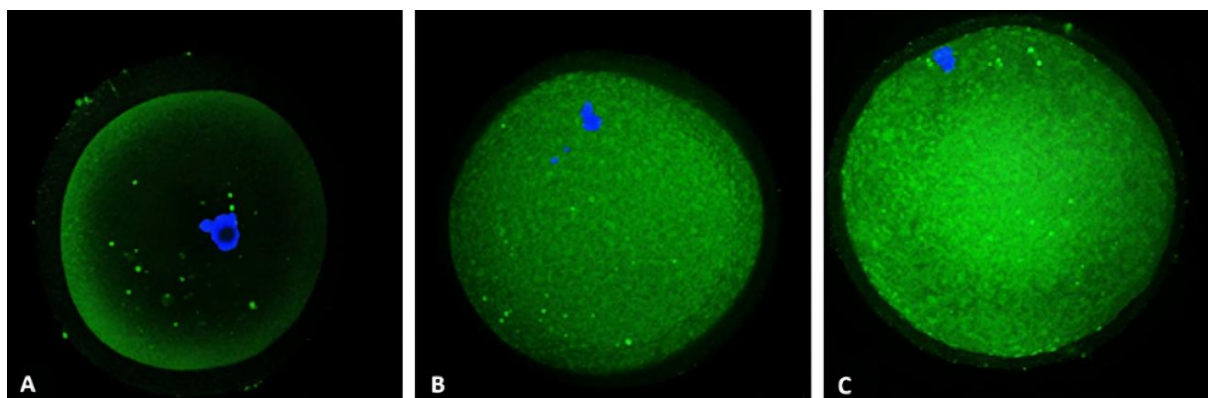
Slično prokariotima, mitohondriji imaju sposobnost fuzije i fisije. Membrana aktivnih mitohondrija je polarizirana i može fuzionirati s drugim mitohondrijima. Fuzija mitohondrijima omogućuje izmjenu komponenti i održavanje stanične kvalitete, poboljšava funkciju mitohondrija s manjim nedostacima te održava integritet mtDNA i štiti je od mutacija. Ako su mitohondriji nefunkcionalni i ako je njihova membrana depolarizirana, oni neće fuzionirati s aktivnim mitohondrijima i ciljano će se ukloniti. Ovi procesi sprječavaju miješanje oštećenih i nefunkcionalnih mitohondrija s onim više kvalitete te tako održavaju razinu kvalitete mitohondrija i mitohondrijskog genoma (Chen i sur. 2010; Mouli i sur. 2009).

#### **2.4.3. Mitohondriji i mitohondrijska DNA oocita**

Oocyte u metafazi mejoze II (MII oocyte) imaju promjer od 110 do 120  $\mu$ m i najveće su stanice u ljudskom organizmu (Farsi i sur. 2013; Zhang i sur. 2017). Osim što su najveće volumenom, imaju i najveći broj mitohondrija (Zhang i sur. 2017). Broj mitohondrija unutar stanica često je indikator aktivnosti stanice. Visoko aktivne stanice poput neurona, mišićnih stanica i oocita imaju više mitohondrija i kopija mtDNA u usporedbi s ostalim vrstama stanica. Ovisno o energetske potrebama, oocyte imaju sposobnost podešavanja

mitohondrijske gustoće u različitim unutarstaničnim regijama (Slika 14). Primijećena je i redistribucija mitohondrija u područja oko diobenih vretena i centara za organiziranje mikrotubula. Sinteza ATP-a neophodna je za sazrijevanje citoplazme i jezgre odnosno pripremu oocite za oplodnju i završetak mejoze II (Assou i sur. 2006; May-Panloup i sur. 2021; St John i sur. 2010; Yu i sur. 2010). Regulacija broja kopija mtDNA je esencijalna za normalnu staničnu funkciju te se mtDNA neprekidno replicira dok oocita sazrijeva. Tijekom sazrijevanja, nezrele oocite su transkripcijski i bioenergetski tiše, odnosno imaju smanjenu proizvodnju ATP-a. Vjeruje se da ove, evolucijski konzervirane osobine imaju izuzetnu važnost u zaštiti mtDNA od mutacija koje bi se kasnije mogle prenijeti na zametak (Zhang i sur. 2017). Tisuće mitohondrija u oocitama nastaju od nekoliko stotina mitohondrija prisutnih u primordijalnim zametnim stanicama (*engl.* primordial germ cells; PGC). Iako replikacija mitohondrija započinje u PGC i nastavlja se tijekom rane oogeneze, najveći skok u broju mitohondrija događa se tijekom kasnijih stadija folikulogeneze (Babayev i Seli 2015). Kako oocita sazrijeva potrebno joj je sve više energije, a energetske potrebe su najveće tijekom ovulacije. Pomak od glikolize do oksidativne fosforilacije opskrbiti će oocitu potrebnom energijom i omogućiti njeno sazrijevanje (Cotterill i sur. 2013). Nakon što oocite sazriju i dosegnu MII stadij, replikacija mitohondrija se zaustavlja i broj kopija mtDNA ostaje postojan (Zhang i sur. 2017). Nakon oplodnje, oocite zahtijevaju značajnu energiju kako bi omogućile ključne procese poput formiranja diobenog vretena, odvajanja kromatida i diobe stanica. Zrele MII oocite sadrže približno 100 000 mitohondrija (Babayev i Seli 2015), s velikim varijacijama u broju kopija mtDNA, koje se kreću od 20 000 do 1 500 000 po stanici (Monnot i sur. 2013; Reynier i sur. 2001). Oocite s nedovoljnim razinama mtDNA, unatoč normalnim spermijima, podložnije su neuspješnoj oplodnji (Reynier i sur. 2001). Smanjena količina mtDNA u oocitama povezuje se s ovarijskom insufijencijom, odnosno smanjenom kvalitetom oocita i starijom dobi majke (Chappel 2013). Dok oocite dobre kvalitete, koje sadrže optimalan broj mitohondrija i proizvode dovoljne količine ATP-a, demonstriraju veći reproduktivni potencijal (Mertens i sur. 2022). Učestalost replikacije i manjak efikasnih mehanizama popravka DNA u mitohondrijima uvjetuju veću osjetljivost mtDNA na oštećenja, te ona ima višestruko veće stope mutacija u usporedbi s nDNA. Veća podložnost mtDNA mutacijama može rezultirati postojanjem više varijanti mtDNA u oociti, odnosno heteroplazmijom (Bi i sur. 2023; Zhang i sur. 2015). Nakupljanje mutacija u mtDNA može ograničiti proizvodnju energije. Posljedično, dolazi do smanjene

sposobnosti održavanja homeostaze stanice, koja se može odraziti nepravilnom segregacijom kromosoma tijekom staničnih dioba. Opisane su brojne različite delecije i mutacije mtDNA. Najčešća među njima je 4.977 bp delecija (*engl.* base pair; bp), koja započinje na poziciji 8470 i završava na poziciji 13459 mtDNA. Značajno povećana učestalost ove delecije zabilježena u oocitama žena starijih od 34 godine te se nakupljanje navedene delecije smatra biljegom starenja (Chan i sur. 2005; Chappel 2013).

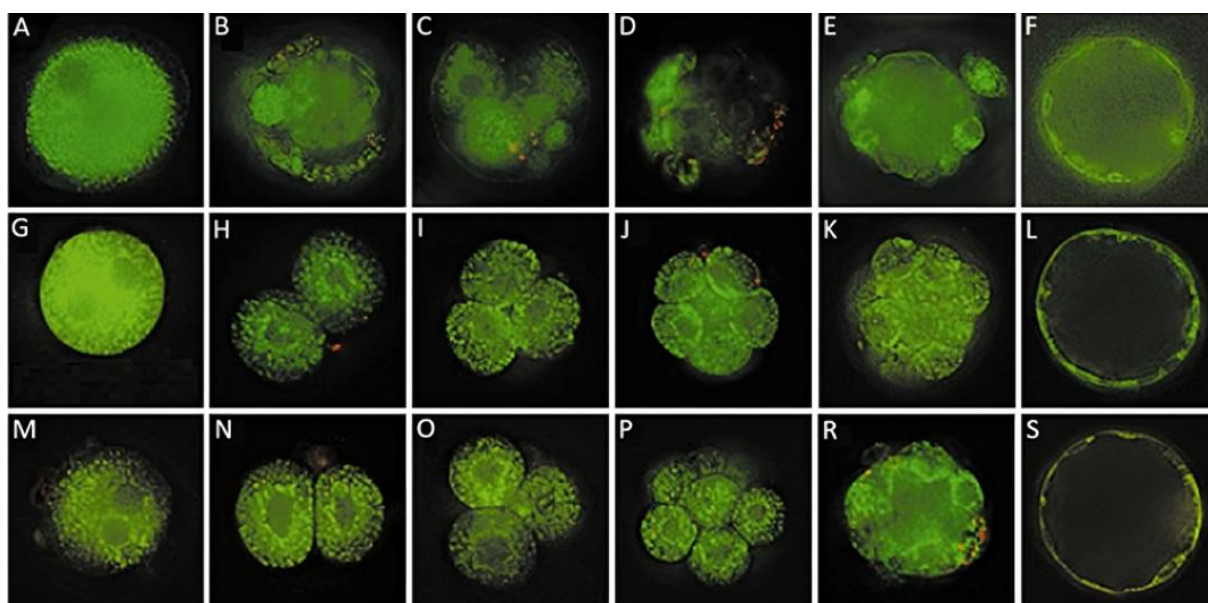


**Slika 14.** Raspodjela mitohondrija praćena konfokalnom mikroskopijom vizualizirana MitoTracker Green FM bojenjem, zelena boja predstavlja mitohondrije: A) Germinalna vezikula s dominantnom raspodjelom mitohondrija u perifernom dijelu citoplazme oocite, B) MII oocita nakon *in vitro* sazrijevanja s podjednako raspoređenim mitohondrijima u citoplazmi, C) MII oocita nakon *in vivo* sazrijevanja s mitohondrijima raspoređenim kroz citoplazmu i izraženijim centralnim nakupljanjem mitohondrija (preuzeto i prilagođeno iz Liu i sur. 2010)

#### **2.4.4. Mitohondriji i mitohondrijska DNA predimplantacijskih zametaka**

Maternalno nasljeđivanje mitohondrija i mtDNA uobičajen je način nasljeđivanja mitohondrijskog genoma kod ljudi te je prijenos majčinog mitohondrijskog genoma na potomstvo od iznimne važnosti. Tijekom oplodnje, mitohondriji spermija uneseni u oocitu podliježu ubikvitinaciji te se razgrađuju uz pomoć proteosoma. Time se osigurava isključivo majčinsko nasljeđivanje mtDNA (homoplazmija) (Chappel 2013). Kada su u oociti prisutne dvije ili više varijanti mtDNA, odnosno kada oocita sadrži različite haplotipove mtDNA koji opstaju nakon oplodnje dolazi do heteroplazmije mtDNA maternalnog podrijetla. Ukoliko heteroplazmija mtDNA opstane nakon oplodnje, može se zadržati tijekom embrionalnog razvoja i pratiti pojedinca kroz čitav životni vijek (Mertens i sur. 2022). U iznimno rijetkim slučajevima zabilježeno je postojanje biparentalnog

nasljeđivanja mtDNA, odnosno heteroplazmija mtDNA uzrokovana prijenosom očinske mtDNA (Luo i sur. 2018), iako se ovi nalazi i mogući mehanizmi nasljeđivanja očinske mtDNA trebaju potvrditi budućim istraživanjima (Hu i sur. 2025). Nakon oplodnje raste potreba za ATP-om, a zametak u potpunosti ovisi o funkcionalnosti mitohondrija i mtDNA naslijeđenih iz oocite. Broj kopija mtDNA po stanici se smanjuje kako se stanice zametka dijele, odnosno kako zigota staničnim diobama napreduje prema stadiju blastociste. Smanjenje količine mtDNA po stanici događa se zbog raspodjele postojećih mitohondrija između sestrinskih stanica i odsutnosti replikacije mtDNA, koja se nastavlja kada embrionalne stanice iniciraju diferencijaciju (Chappel 2013; Mertens i sur. 2022; St John i sur. 2010; St John 2014, Thundathil i sur. 2005) (Slika 15).

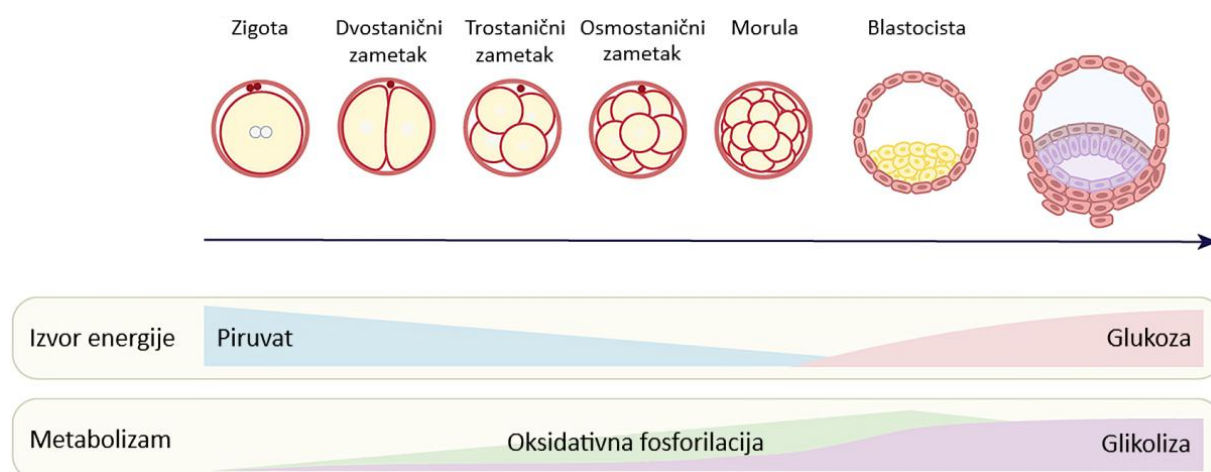


**Slika 15.** Ljudski zameci donirani za istraživanje (sa zastojem u razvoju, visokog stupnja fragmentacije ili loše kvalitete), *in vivo* i *in vitro* oplođeni mišji zameci obojeni lipofilnom kationskom bojom JC-1 koja ulazi u matriks mitohondrija u monomernom obliku tijekom polarizacije mitohondrijske membrane, vizualizirani dekonvolucijskim mikroskopom. *In vitro* ljudski zameci: A) zigota, B) dvostanični zametak, C) petostanični zametak D) osmostanični zametak, E) morula, F) blastocista. *In vivo* oplođeni mišji zameci: G) zigota, H) dvostanični zametak, I) četverostanični zametak, J) osmostanični zametak K) morula, L) blastocista. *In vitro* mišji zameci: M) zigota, N) dvostanični zametak, O) četverostanični zametak, P) osmostanični zametak, R) morula, S) blastocista (preuzeto i prilagođeno iz Acton i sur. 2004)

Tijekom ranog embrionalnog razvoja, mitohondriji naslijeđeni iz oocite trebaju osigurati dovoljnu sintezu ATP-a i zadovoljiti energetske potrebe zametaka (Lin i sur. 2004). Osim zadovoljavanja energetske potrebe, mitohondriji imaju ulogu i u vezivanju kalcija. Porast kalcijevih iona u citoplazmi je esencijalan za aktivaciju oocita i razvoj zametaka nakon oplodnje. Oscilacije kalcijevih iona događaju se nakon što spermiji fuzioniraju sa membranom oocite ili nakon što su injektirani u citoplazmu oocite u postupku ICSI-ja. Povećanje protoka kalcija unutar stanice inducira ekspresiju enzima lanca prijenosa elektrona koji će oksidativnom fosforilacijom povećati proizvodnju ATP-a (Dumollard i sur. 2004; Van Blerkom 2004).

## 2.5. Metabolizam predimplantacijskih zametaka

Dosadašnja znanstvena saznanja ukazuju da oboje, aerobno i anaerobno disanje pomažu zadovoljiti energetske potrebe ranih zametaka. Zbog nedovoljne efikasnosti anaerobnog disanja, proizvodnja ATP-a oksidativnom fosforilacijom je važan izvor energije u razvoju predimplantacijskih zametaka brojnih vrsta uključujući i ljude (Chappel 2013; El Shourbagy i sur. 2015; May-Panloup i sur. 2005; Spikings i sur. 2007; Thouas i sur. 2005) (Slika 16).



**Slika 16.** Grafički prikaz metabolizma tijekom razvoja zametka. Zigota i stanični stadiji zametaka u velikoj mjeri ovise o piruvatu kao izvoru energije i ugljika. Tijekom kompakcije i stadija morule povećava se kapacitet iskorištavanja glukoze kao izvora energije, dok se blastociste okreću glukozi i primarno je koriste kao izvor energije putem glikolize (preuzeto i prilagođeno iz Gou i Zhang 2023)

Tiha embrionalna hipoteza (*engl.* Quiet embryo hypothesis) pretpostavila je da “tiha” odnosno niža metabolička aktivnost predstavlja veću vijabilnost predimplantacijskih zametaka (Leese 2002). Međutim, novija istraživanja ukazuju da je vijabilnost povezana s aktivnijim metabolizmom (Gardner i Wale 2013), gdje je porast metaboličke aktivnosti izražen tijekom razdoblja kada zametak povećava unos glukoze (Gardner i sur. 2011).

### **2.5.1. Razlike metabolizma staničnih stadija zametka, morule i blastociste**

Predimplantacijski zameci proizvode energiju anaerobnom i aerobnom glikolizom. Tijekom prva tri dana razvoja, metabolizam zametaka uglavnom ovisi o anaerobnoj glikolizi. U ovom vremenskom razdoblju piruvat je ključni izvor energije, on se pretvara u acetil-CoA, koji zatim ulazi u ciklus trikarboksilnih kiselina (Krebsov ciklus), oslobađajući elektrone potrebne za oksidativnu fosforilaciju. Nasuprot tome, korištenje glukoze svedeno je na minimum. Zameci staničnog stadija imaju visok omjer ATP-a i ADP-a koji će inhibirati fosfofrukto-kinazu. Fosfofrukto-kinaza ograničava protok glukoze kroz glikolitički put, sve do kompakcije zametka. Stanična faza zametka odlikuje se replikacijom DNA i staničnim diobama te odsustvom porasta staničnog volumena, što posljedično rezultira smanjenim energetskeim zahtjevima. Za vrijeme kompakcije, odnosno stadija morule povećava se kapacitet zametka za iskorištavanje glukoze kao izvora energije. Zametak troši više kisika, a zamijećena potrošnja je najvjerojatnije povezana s višim energetskeim potrebama koje su posljedica formacije blastociste, rasta i ekspanzije blastocela. Dolazi do smanjenja omjera ATP-a i ADP-a te porasta razine adenozin-monofosfata (*engl.* adenosine monophosphate; AMP). Aktivnosti fosfofrukto-kinaze se povećava, a shodno tome povećava se i protoka glukoze kroz proces glikolize. Iako blastocista koristi glukozu kao glavni izvor energije, slično tumorskim stanicama, oksidira otprilike 50 % glukoze dok ostatak pretvara u laktat. Ova pojava je vjerojatno prilagodba proliferaciji, diferencijaciji embrionalnih stanica i skoroj implantaciji, koja će biti okarakterizirana anoksičnim uvjetima (da Fonseca Junior i sur. 2023; Gardner i Wale 2013; Gou i Zhang 2023; May-Panloup i sur. 2021).

### 3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u ustanovi Pacific Fertility Institute (Saipan, Sjevernomarijansko otočje, Sjedinjene Američke Države) od prosinca 2015. do travnja 2020. godine. Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu (Ur. Broj: 380-59-10106-20-111/58; Klasa: 641-01/20-02/01) te Etičkog povjerenstva (*engl.* Institutional Review Board; IRB) Pacific Fertility Institute (DTD: 01-31-2020). Za potrebe istraživanja koristili su se bioinformatički podaci ispitanika koji su prošli IVF postupak. Svi ispitanici su detaljno upoznati o istraživanju i usuglasili da se njihovi podaci koriste u istraživanju te su potpisali za to predviđen obrazac informiranog pristanka. Svi podaci ispitanika vođeni su pod identifikacijskim brojevima kako bi se osigurala anonimnost i sigurnost ispitanika. Istraživanje se temelji na Helsinškoj deklaraciji o etičkim postavkama medicinskih istraživanja na ljudima (World Medical Association 2013) te je u skladu sa zakonima Republike Hrvatske, Sjevernomarijanskih otoka i Sjedinjenih Američkih Država.

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanje su uključeni ispitanici azijskog podrijetla nastanjeni na području Kine. Kriteriji za uključenje bioinformatičkih podataka ispitanika u istraživanje bili su: dob pacijentice u trenutku postupka MPO manja od 35 godina, uredni testovi na infektivne bolesti, uredni nalazi hormona za oba partnera, uvjet da su u IVF postupku korištene homologne gamete partnera te uredna oplodnja morfološki optimalnih oocita. Pri izboru ispitanika uzeli su se u obzir i razlozi odluke za NGS PGT-A testiranje zametaka te su isključeni svi ispitanici kod kojih je jedan od roditelja nositelj strukturnog razmještanja s visokim rizikom dobivanja nebalansiranog potomstva. Iz istraživanja su se isključili ispitanici koji su imali više od dva neuspjela IVF postupka, ispitanici s autoimunim i kroničnim bolestima te ispitanice s indeksom tjelesne mase (*engl.* body mass indeks; BMI)  $> 25 \text{ kg/m}^2$ .

### **3.2. Bioinformatički i morfokinetski podatci te kriteriji za razvrstavanje blastocista po skupinama**

Istraživanje je obuhvatilo bioinformatičke i morfokinetske podatke 159 zametaka odnosno blastocista. Podatke o morfokinetici zametaka prikupio sam embriološkim praćenjem razvoja zametaka, dok su bioinformatički podaci prikupljeni dijagnostičkim postupkom NGS PGT-A. Blastociste sam razvrstao u pet skupina koje su definirane ploidijom i morfološkim ocjenama blastocista. Navedene skupine uključivale su visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu (skupina V5) i šestom danu razvoja (skupina V6), kao i niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu (skupina N5) i šestom danu razvoja (skupina N6). Peta skupina uključivala je aneuploidne blastociste formirane u petom danu i šestom danu razvoja (skupina A; Tablica 4).

Visokokvalitetne blastociste su one kojima su embrioblast i trofoektoderm ocjenjeni s A ili B (ili kombinacijom A i B). Niskokvalitetne blastociste su one kojima su embrioblast ili trofoektoderm ocjenjeni sa C (ili kombinacijom B i C). Stupanj ekspanzije blastocela svih blastocista uključenih u istraživanje bio je 4. Blastociste koje su stupanj ekspanzije 4 postigle nakon pet dana *in vitro* kultivacije su dan-5 blastociste, odnosno dan-6 blastociste ako im je za isto trebalo šest dana. Blastociste koje su imale uredne nalaze NGS PGT-A su kategorizirane kao euploidne, dok su blastociste kojima je NGS PGT-A metodom detektirana aneuploidija kategorizirane kao aneuploidne.

**Tablica 4.** Vrste aneuploidije, zahvaćeni kromosomi i regije kromosoma zahvaćene aneuploidijom kod blastocista u skupini A. Svaki redak odgovara jednoj blastocisti

| <i>Zahvaćeni kromosom/i</i> | <i>Zahvaćena regija kromosoma</i> | <i>Vrsta aneuploidije</i> |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 16                          | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 14                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 1                           | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 12, 22                      | Cijeli kromosomi                  | Trisomija, trisomija      |
| 4                           | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 2                           | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 22                          | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 15                          | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 6                           | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 16                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 17                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 18                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 4                           | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 14                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| X                           | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 4                           | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 22                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 13                          | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 16                          | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 15, 18                      | Cijeli kromosomi                  | Monosomija, trisomija     |
| 4, 16                       | Cijeli kromosomi                  | Trisomija, trisomija      |
| 4, 12                       | Cijeli kromosomi                  | Monosomija, trisomija     |
| 7, X                        | Cijeli kromosomi                  | Trisomija, monosomija     |
| 6                           | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| X                           | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 16                          | Cijeli kromosom                   | Trisomija                 |
| 13                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 15                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 13                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 14                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 20                          | Cijeli kromosom                   | Monosomija                |
| 16, 19                      | Cijeli kromosomi                  | Monosomija                |
| 14, 18                      | Cijeli kromosomi                  | Monosomija                |
| 15, 21                      | Cijeli kromosomi                  | Trisomija                 |

### 3.3. Uvjeti kultivacije zametaka

Zameci su kultivirani u kultivacijskom mediju (Continuous Single Culture, Irvine Scientific, Sjedinjene Američke Države) uz dodatak 5 % humanog seruma albumina (Human Serum Albumin; HSA, Irvine Scientific, Sjedinjene Američke Države). U Petrijevim posudicama veličine 60 × 15 mm (Falcon, USA) kapljice kultivacijskog medija s HSA, volumena 50 µL, prekrivene su s 11 ml mineralnog ulja (Oil for Embryo Culture, Irvine Scientific, USA).

Za kultivaciju zametaka korišteni su inkubatori PLANER BT37 (Origio, Denmark) (Slika 17), u kojima se kultivacija provodila pri temperaturi od 37 °C i relativnoj vlažnosti ≥ 90 %. Inkubator PLANER BT37 koristi mješavinu plinova (5 % O<sub>2</sub>, 6 % CO<sub>2</sub>, 89 % N<sub>2</sub>).



**Slika 17.** Origio BT37 inkubator

Pripremljene kultivacijske posudice smo inkubirali 12 sati prije početka kultivacije zametaka kako bi se pH medija stabilizirao na zadanim parametrima (5 % O<sub>2</sub>, 6 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Zameci su kultivirani zasebno po principu jedan zametak po mikrokapljici.

Laboratorijski dio IVF postupka odvijao se u čistoj sobi, odnosno u laboratorijskom prostoru sa zasebnom filtracijom, klimatizacijom i kontroliranim kruženjem zraka, u kojem zrak ima pozitivan tlak u odnosu na okolne prostorije. Temperatura zraka (u rasponu od 23°C do 24°C), relativna vlažnost zraka (40 - 50 %), razina osvjetljenja, buke i vibracija u čistoj sobi strogo su svakodnevno kontrolirani i održavani. Svi laboratorijski IVF koraci izuzev ICSI-a, procjene morfologije zametaka i biopsije blastocista rađeni su unutar IVF komore Origio IVF CHAMBER (6 % CO<sub>2</sub>; Origio, Danska) i besprašne komore IVFtech Sterile 180cm (IVFtech, Denmark) s ugrađenom grijanom pločom (37°C) (Slika 18). ICSI, procjenu morfologije zametaka i biopsije blastocista radio sam na invertnom mikroskopu Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Japan) s grijanom pločom (Tokai Hit, Japan) pri 37°C.



**Slika 18.** Besprašna komora IVFtech Sterile 180cm s trinokularnim stereomikroskopom Nikon SMZ-U

### **3.4. Procjena morfologije, kinetike diobe stanica i ocjenjivanje zametaka**

Procjenu morfologije i kinetike diobe stanica zametaka u svim fazama razvoja radio sam na invertnom mikroskopu Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Japan) s grijanom pločom Tokai Hit

Thermo Plate (Tokai Hit, Japan) pri 37 °C i povećanju od 200 puta te sam odmah nakon ocjenjivanja zametaka kultivacijske posudice sa zamecima vraćao u inkubator.

#### ***3.4.1. Procjena oplodnje oocita (1. dan kultivacije)***

Provjeru i ocjenu oplodnje radio sam 17 ± 1 sati nakon inseminacije oocita (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011). Ukoliko su oocite bile inseminirane metodom IVF, prije provjere oplodnje ostatci stanica granulose odstranjeni su uz pomoć mikropipete promjera 135 µm. Proces denudacije oocita učinjen je u besprašnoj komori IVFtech Sterile 180cm s grijanom pločom (IVFtech, Denmark), pomoću stereomikroskopa Nikon SMZ-U (Nikon, Japan). Pravilno oplođene oocite su one s dva pronukleusa i bez popratnih morfoloških nepravilnosti.

#### ***3.4.2. Procjena morfologije zametaka (2. i 3. dan kultivacije)***

Procjenu morfologije zametaka u drugom i trećem danu razvoja radio sam prema prilagođenom Istanbulsom konsenzusu (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011), gdje je ocjena 1 predstavljala najvišu kvalitetu. Ocjenjivanje sam prilagodio dodavanjem međuocjena u svrhu preciznijeg opisivanja zametaka koji su imali granične morfološke vrijednosti. Na primjer, ukoliko je kvaliteta zametka bila između ocjena 1 i 2, ocjena je zabilježena kao 1 - 2 (ili 1,5). Slično, prilagodio sam i procjenu stupnja fragmentacije zametaka: odsustvo fragmentacija zabilježio sam kao 0, 0 - 5 % fragmentacije zabilježio sam kao 0,5, 5 - 10 % fragmentacije kao 1, 10 - 25 % fragmentacije kao 2, dok sam ≥ 25 % fragmentacije zabilježio kao 3.

#### ***3.4.3. Procjena morfologije zametaka (4. dan kultivacije)***

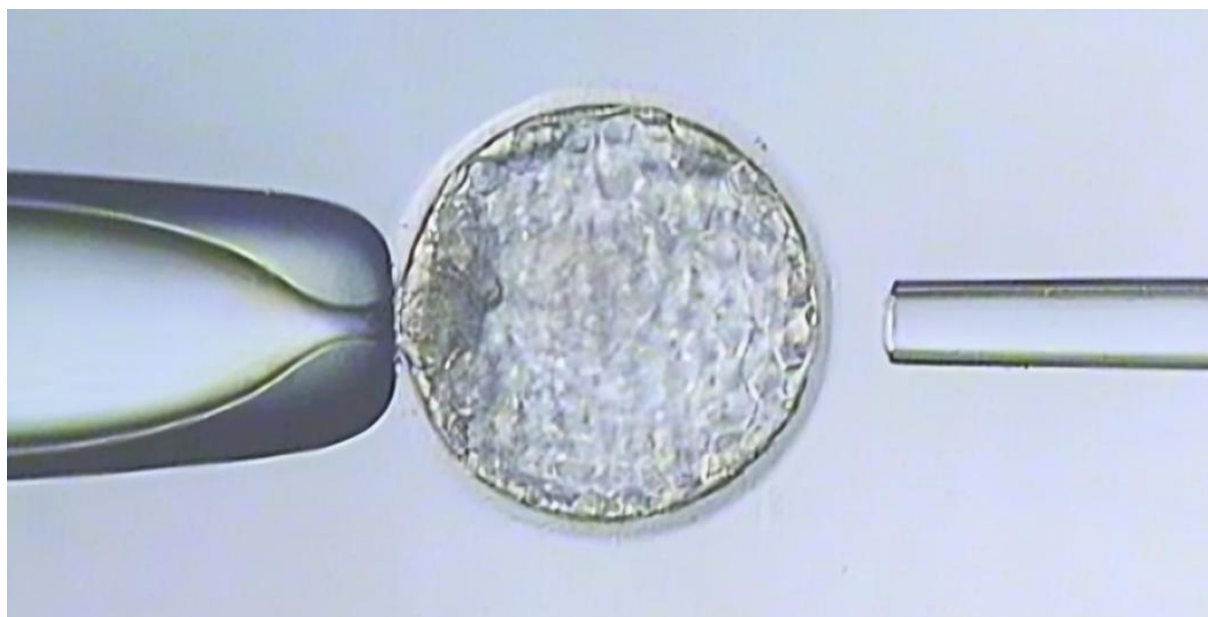
Procjena morfologije zametaka u četvrtom danu razvoja učinjena je po prilagođenom Istanbulsom konsenzusu (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011). Zametke koji su u potpunosti kompaktirali ocijenio sam sa 1, zametke koji su započeli kompaktiranje ali nisu u potpunosti kompaktirali ocijenio sam sa 0,5, dok sam ocjenu zametaka koji još nisu započeli proces kompaktiranja zabilježio kao 0.

#### **3.4.4. Procjena morfologije zametaka (5. i 6. dan kultivacije)**

Zameci u petom i šestom danu razvoja, odnosno blastociste, ocijenio sam prema standardnim kriterijima na osnovi morfologije i kinetike diobe stanica (Gardner i Schoolcraft 1999).

#### **3.5. Biopsija blastocista**

Bioptirao sam blastociste uključene u studiju, gdje je pristup bioptiranja od strane jednog kliničkog embriologa odabran u svrhu postizanja veće konzistentnosti pri određivanju trenutka biopsije i broju bioptiranih stanica. Posebna pozornost je pridodana određivanju trenutka biopsije koji je bio ovisan o stupnju ekspanzije blastocela i staničnosti blastocista. Sve biopsije su učinjene pri stupnju ekspanzije blastocela 4, bez prethodnog LAH-a (Slika 19).



**Slika 19.** Blastocista stupnja ekspanzije blastocela 4 neposredno pred biopsiju. Mikropipeta za pridržavanja je na lijevoj strani slike, dok je mikropipeta za biopsiju na desnoj strani slike. Embrioblast je orijentiran prema mikropipeti za pridržavanje. Mikropipeta za pridržavanje fiksira blastocistu tijekom biopsije, dok se uz pomoć mikropipete za biopsiju i pulsirajućih laserskih zraka, nakon otvaranja *zone pellucide*, bioptira pet to deset stanica trofoektoderma koje su nasuprot embrioblasta

Neposredno prije biopsije, blastociste su prebačene iz kultivacijskog medija u preinkubirane (37 °C) posudice sa mikrokapljicama Multipurpose Handling Medium (Irvine Scientific, Sjedinjene Američke Države) uz dodatak 5 % HSA (Human Serum Albumin, Irvine Scientific, Sjedinjene Američke Države) i prekrivene mineralnim uljem (Oil for Embryo Culture, Irvine Scientific, Sjedinjene Američke Države). Biopsije su rađene pri povećanju od 400 puta uz pomoć invertnog mikroskopa Ti-S (Nikon, Japan) s grijanom pločom Thermo Plate (Tokai Hit, Japan) pri 37°C, kamerom WAT-221S (Watec, Japan), laserskim sustavom Saturn Laser System (Research Instruments, United Kingdom), sustavom za mikromanipulaciju NT-88-V3 (Nikon Narishige, Japan) te mikropipetama za pridržavanje MPH-MED-30 (Origio, Sjedinjene Američke Države) i biopsiju zametaka MBB-FP-M-30 (Origio, Sjedinjene Američke Države) (Slika 20).



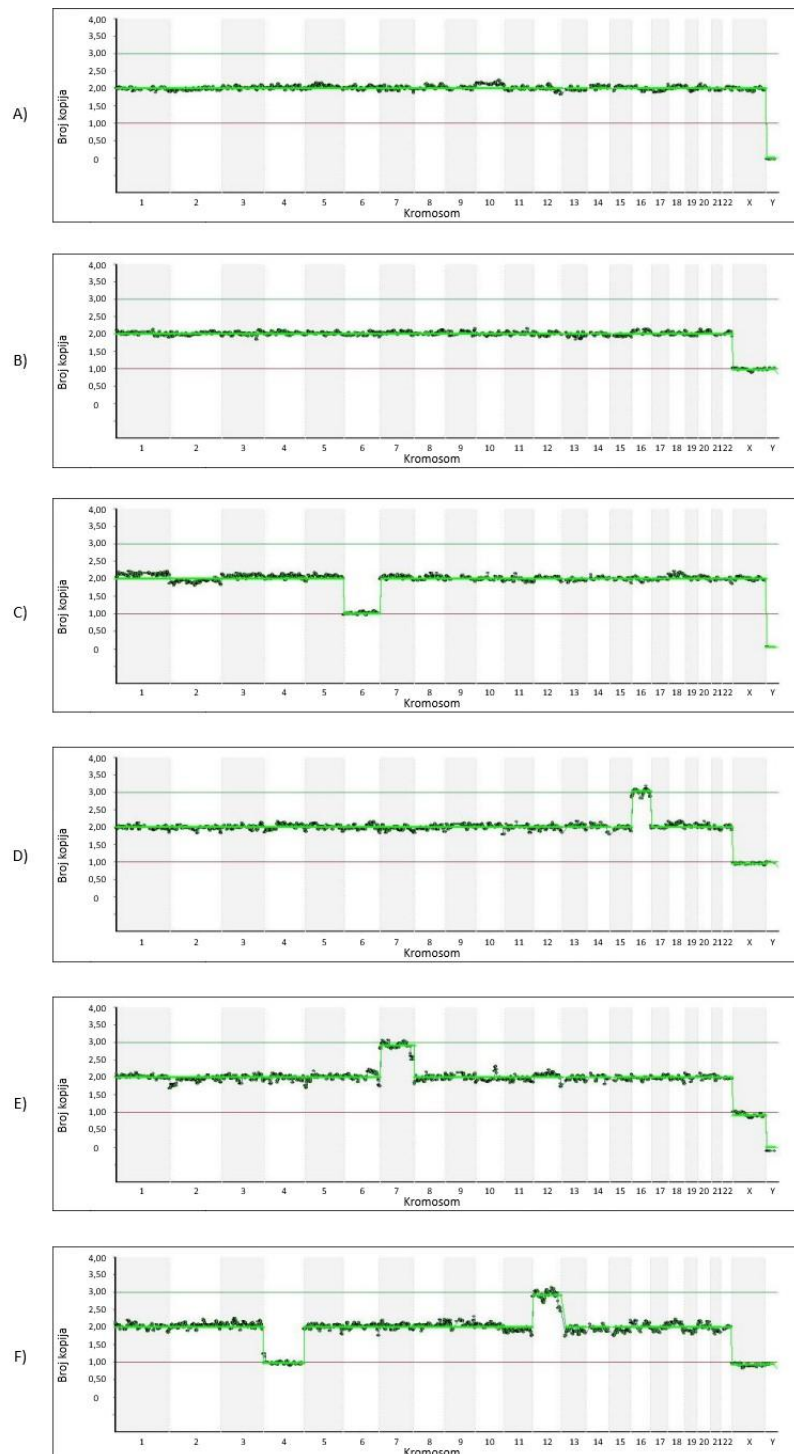
**Slika 20.** Invertni mikroskop Nikon Eclipse Ti-S opremljen s kamerom Watec WAT-221S, grijanom pločom Tokai Hit Thermo Plate, laserom Research Instruments Saturn Laser System, i sustavom za mikromanipulaciju Nikon Narishige NT-88-V3

Nakon biopsije pet do deset stanica trofoektoderma, bioptirane stanice su isprane u puferu za ispiranje stanica (Genetics Generation Advancement Corp., Tajvan) i prebačene

u mikrotubice s lizirajućim puferom (Genetics Generation Advancement Corp., Tajvan) te kriopohranjene do NGS PGT-A. Odmah nakon biopsije, blastociste su prebačene u kultivacijske posudice te su nakon reekspanzije blastocela kriopohranjene uz pomoć vitifikacijskog medija (Vit Kit-Freeze, Irvine Scientific, Sjedinjene Američke Države).

### **3.6. Predimplantacijsko genetičko testiranje za aneuploidiju tehnologijom sekvenciranja nove generacije**

NGS PGT-A analiza provedena je uz pomoć VeriSeq PGS kita (Illumina, Sjedinjene Američke Države) i uređaja MiSeq System (Illumina, Sjedinjene Američke Države) koji koriste NGS tehnologiju te omogućuju opsežnu i preciznu obradu sva 24 ljudska kromosoma (Fiorentino i sur. 2014). Cjelogenomsko umnažanje (*engl.* Whole Genome Amplification; WGA) se provelo uz pomoć Sureplex DNA Amplification System kita po uputama proizvođača. Sureplex DNA Amplification System se koristi u svrhu stvaranja kopija nativne DNA iz jednostaničnih ili višestaničnih uzoraka. Umnožavanje DNA SurePlex DNA Amplification kitom se temelji na nasumičnoj fragmentaciji genomske DNA te daljnjim umnožavanjem DNA uz pomoć lančane reakcije polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction; PCR). Nakon uspješnog umnožavanja DNA uslijedilo je NGS sekvenciranje umnoženih uzoraka sa VeriSeq DNA Library Kit-PGS i MiSeq Reagent Kit v3-PGS na uređaju MiSeq System po uputama proizvođača. MiSeq Reagent Kit v3-PGS kit sadrži reagentse potrebne za sekvenciranje, dok se uz pomoć VeriSeq DNA Library Kit-PGS kita pripremaju SRL (*engl.* sequencing-ready libraries) od uzoraka umnoženih SurePlex DNA kitom. Uz pomoć programa MiSeq Reporter Software, podatci dobiveni pri koraku sekvenciranja usporedili su se s referentnim ljudskim genomom GRCh37 (*engl.* genome reference consortium human build 37; GRCh37) (Genome Reference Consortium 2009). Završna obrada bioinformatičkih podataka nakon NGS-a, njihova vizualizacija te identifikacija aneuploidije odnosno euploidije sproveda se s programom BlueFuse Multi Analysis Software (Illumina, San Diego, Sjedinjene Američke Države) (Slika 21).



Slika 21. Vizualizacija podataka predimplantacijskog genetičkog testiranja za aneuploidiju. A) euploidna XX blastocista, B) euploidna XY blastocista, C) aneuploidna XX blastocista (monosomija 6), D) aneuploidna XY blastocista (trisomija 16), E) aneuploidna X0 blastocista (trisomija 7, monosomija X), F) aneuploidna XY blastocista (monosomija 4, trisomija 12). Blastociste A i B su primjeri vizualizacije podataka predimplantacijskog genetičkog testiranja za aneuploidiju iz skupine V5, dok su C, D, E i F primjeri vizualizacije iz skupine A

### 3.7. Određivanje omjera mitohondrijske i jezgrine DNA

Određivanje omjera mtDNA ( $m_{NGS}$ ) provedeno je prema protokolu opisanom od strane Victora i sur. (2017). Bioinformatičke datoteke u formatima BAM i FASTQ dobivene NGS PGT-A obradom uzoraka programom MiSeq Reporter Software, su se učitale u program Geneious R9 (Biomatters, Novi Zeland) u svrhu određivanja vrijednosti  $r_m$  i  $r_n$ . Vrijednost  $r_m$  predstavlja broj očitanih kopija mitohondrijske DNA, dok  $r_n$  predstavlja broj očitanih kopija jezgrine DNA. Omjer vrijednosti  $r_m$  i  $r_n$  pomnožio se s faktorom korekcije  $F_{NGS}$  odnosno omjer mitohondrijske DNA izračunao se po formuli:  $m_{NGS} = r_m / r_n \times F_{NGS}$ .  $F_{NGS}$  uzima u obzir dva parametra neophodna za izračunavanje  $m_{NGS}$ . Prvi parametar je spol zametaka dok je drugi parametar ploidija zametaka. S obzirom na GRCh37 (Genome Reference Consortium 2009), izračunato je da se ženski genom sastoji od 6 072 607 692 baznih parova, dok se muški genom sastoji od 5 976 710 698 baznih parova (razlika od 1,58 %). Bez faktora korekcije, rezultati za sve muške zametke bili bi lažno uvećani za navedenu razliku.  $F_{NGS}$  za sve muške zametke je 0,9842. Slično tome, aneuploidni zameci imaju manje ili više genetskog materijala u odnosu na euploidne zametke. Ovisno o kromosomskom statusu zametka, za svaki zametak se izračunao zaseban faktor korekcije (Tablica 5). Vrijednost  $m_{NGS}$  svakog zametka se pomnožila s faktorom korekcije prilagođenim njegovom kromosomskom statusu (Victor i sur. 2017).

**Tablica 5.** Faktori korekcije za precizno izračunavanje količine mtDNA kod aneuploidnih zametaka temeljeni na referentnom ljudskom genomu GRCh37 (prilagođeno iz Victor i sur. 2017)

| Kromosom | Broj parova baza | Faktor korekcije za monosomiju | Faktor korekcije za disomiju | Faktor korekcije za trisomiju |
|----------|------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1        | 249,250,621      | 0.958954928                    | 1                            | 1.041045072                   |
| 2        | 243,199,373      | 0.95995141                     | 1                            | 1.04004859                    |
| 3        | 198,022,430      | 0.967390874                    | 1                            | 1.032609126                   |
| 4        | 191,154,276      | 0.96852188                     | 1                            | 1.03147812                    |
| 5        | 180,915,260      | 0.970207978                    | 1                            | 1.029792022                   |
| 6        | 171,115,067      | 0.971821814                    | 1                            | 1.028178186                   |
| 7        | 159,138,663      | 0.973794016                    | 1                            | 1.026205984                   |
| 8        | 146,364,022      | 0.975897665                    | 1                            | 1.024102335                   |
| 9        | 141,213,431      | 0.976745833                    | 1                            | 1.023254167                   |
| 10       | 135,534,747      | 0.977680964                    | 1                            | 1.022319036                   |
| 11       | 135,006,516      | 0.97776795                     | 1                            | 1.02223205                    |
| 12       | 133,851,895      | 0.977958086                    | 1                            | 1.022041914                   |
| 13       | 115,169,878      | 0.981034527                    | 1                            | 1.018965473                   |
| 14       | 107,349,540      | 0.982322332                    | 1                            | 1.017677668                   |
| 15       | 102,531,392      | 0.983115756                    | 1                            | 1.016884244                   |
| 16       | 90,354,753       | 0.98512093                     | 1                            | 1.01487907                    |
| 17       | 81,195,210       | 0.986629268                    | 1                            | 1.013370732                   |
| 18       | 78,077,248       | 0.987142715                    | 1                            | 1.012857285                   |
| 19       | 59,128,983       | 0.990263                       | 1                            | 1.009737                      |
| 20       | 63,025,520       | 0.989621342                    | 1                            | 1.010378658                   |
| 21       | 48,129,895       | 0.992074262                    | 1                            | 1.007925738                   |
| 22       | 51,304,566       | 0.991551477                    | 1                            | 1.008448523                   |
| X        | 155,270,560      | 0.974430991                    | 1                            | 1.025569009                   |
| Y        | 59,373,566       | 0.990222723                    | 1                            | 1.009777277                   |

### 3.8. Statistička analiza

Numeričke varijable prikazane su medijanom i interkvartilnim rasponom, dok su kategorijske varijable izražene brojem i postotkom. Normalnost distribucije numeričkih varijabli procijenjena je grafički i Shapiro-Wilkovim testom.

Sve numeričke varijable bile su neparametrijski distribuirane i uspoređene Mann-Whitney U testom u slučaju usporedbe dvaju skupina ili Kruskal-Wallisovim testom u slučaju usporedbe više od dvaju skupina.

Dunnov test s Benjamini-Hochbergovom korekcijom korišten je za parne usporedbe poslije provođenja Kruskal-Wallisova testa. Ovisnost kategorijskih i numeričkih varijabli grafički je prikazana pravokutnim dijagramom (*engl.* boxplot). Pritom, horizontalna crna linija označava medijan raspodjele, pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele, a vertikalna linija označava raspon od -2 do 2 interkvartila raspona od medijana raspodjele.

Korelacija između numeričkih varijabli izražena je Spearmanovim korelacijskim koeficijentom i analizirana korelacijskim testom. Ovisnost dvaju numeričkih varijabli prikazana je točkastim dijagramom (*engl.* dotplot) s pravcem čiji je nagib izračunat metodom najmanjih kvadrata. Ovisnost kategorijskih varijabli ispitana je hi-kvadrat testom ili Fisherovim egzaktnim testom u slučaju nedostatnih vrijednosti očekivanih frekvencija uspoređivanih kategorija.

Binarna logistička regresija korištena je za klasifikaciju zametaka s obzirom na kvalitetu, gdje je pri izboru najboljeg modela korištena metoda najboljeg podskupa.

Preciznost modela izračunata je peterostrukom kros-validacijom. Krivulja ROC (*engl.* receiver operating characteristic) izrađena je pomoću mjera senzitivnosti i specifičnosti izračunatih kros-validacijom. Intervali pouzdanosti za površinu ispod krivulje (*engl.* area under the curve; AUC) izračunati su DeLong-ovom metodom. Najbolje granične vrijednosti prediktora izračunate su pomoću kriterija najvećeg Youdenova indeksa. Svi statistički testovi bili su dvostrani s razinom značajnosti postavljenom na 95 %. Podaci su analizirani u programu R (verzija 4.4.1.) pomoću paketa ggplot2 (verzija 2.3.3.) i ggpubr (verzija 0.4.0.).

### **3.9. Cilj i hipoteze istraživanja**

Cilj rada je istražiti povezanost količine, odnosno omjera mitohondrijske i jezgrine DNA s ploidijom blastocista, morfološkim karakteristikama blastocista, morfokinetikom kvalitetom razvojnih stadija zametaka koji su prethodili stadiju blastocista, danom nastanka blastocista, spolom zametaka te dobi majke u trenutku MPO zahvata.

Omjer mitohondrijske i jezgrine DNA je mogući dodatni biomarker procjene uspjeha razvoja zametka nastalih u postupcima izvantjelesne oplodnje te je količina mtDNA povezana sa ploidijom zametka i morfokinetikom osobinama zametka.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Osnovne karakteristike analiziranih blastocista

U ovo istraživanje uključeno je 159 zametaka podijeljenih u pet skupina definiranih kvalitetom blastociste, danom formiranja potpuno ekspandirane blastociste i ploidiom blastociste (Tablica 6). Navedene skupine uključivale su visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu (V5,  $n = 32$ ) i šestom danu razvoja (V6,  $n = 30$ ), kao i niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu (N5,  $n = 32$ ) i šestom danu razvoja (N6,  $n = 31$ ). Peta skupina uključivala je aneuploidne blastociste (A,  $n = 34$ , od kojih je 15 (44,1 %) bilo formirano u petom danu razvoja, a 19 (55,9 %) u šestom danu razvoja. Od svih analiziranih blastocista, njih 82 (51,6 %) je imalo spolne kromosome XX, dok je 77 (49,4 %) blastocista imalo kromosome XY. Samo u skupini N5 dominirale su blastociste ženskoga spola (XX kromosomi) (OR = 4,38, 95 % CI 1,68 - 12,91,  $p < 0,001$ ), dok kod ostalih skupina nije utvrđena značajna razlika u udjelu blastocista s obzirom na spol ( $p = 0,481$ ). Nadalje, nije pronađena značajna ovisnost između spolnih kromosoma i kvalitete blastociste (skupine V5 + V6 vs. N5 + N6,  $p = 0,101$ ), kao ni između spolnih kromosoma i dana razvitka blastociste (V5 + N5 vs. V6 + N6,  $p = 0,153$ ). Također, nije pronađena značajna ovisnost između spola blastociste i ploidijske (p = 0,572).

Dob majke nije se razlikovala između analiziranih skupina ( $p = 0,183$ ), pri čemu također nije uočena značajna ovisnost između dobi majke i kvalitete blastociste ( $p = 0,729$ ), dobi majke i dana razvoja blastociste ( $p = 0,650$ ), ili dobi majke i ploidijske blastociste ( $p = 0,102$ ). U analiziranim skupinama uspoređeni su i razvojni parametri zametka. Uočena je značajna razlika između broja stanica u drugom danu razvoja zametka u analiziranim skupinama ( $p = 0,011$ ), pri čemu su zameci skupine N6 imali značajno veći broj stanica u drugom danu od ostalih zametaka (medijani 5 i 4,  $p = 0,004$ ). Nije pronađena značajna razlika u broju stanica u drugom danu razvoja zametka između ostalih analiziranih skupina ( $p = 0,186$ ). Također, nije pronađena razlika u broju stanica u trećem danu razvoja zametka između analiziranih skupina ( $p = 0,737$ ). Skupine blastocista nisu se značajno razlikovale u stupnju fragmentacije zametka u drugom danu razvoja ( $p = 0,760$ ), niti u stupnju fragmentacije zametka u trećem danu razvoja ( $p = 0,1194$ ).

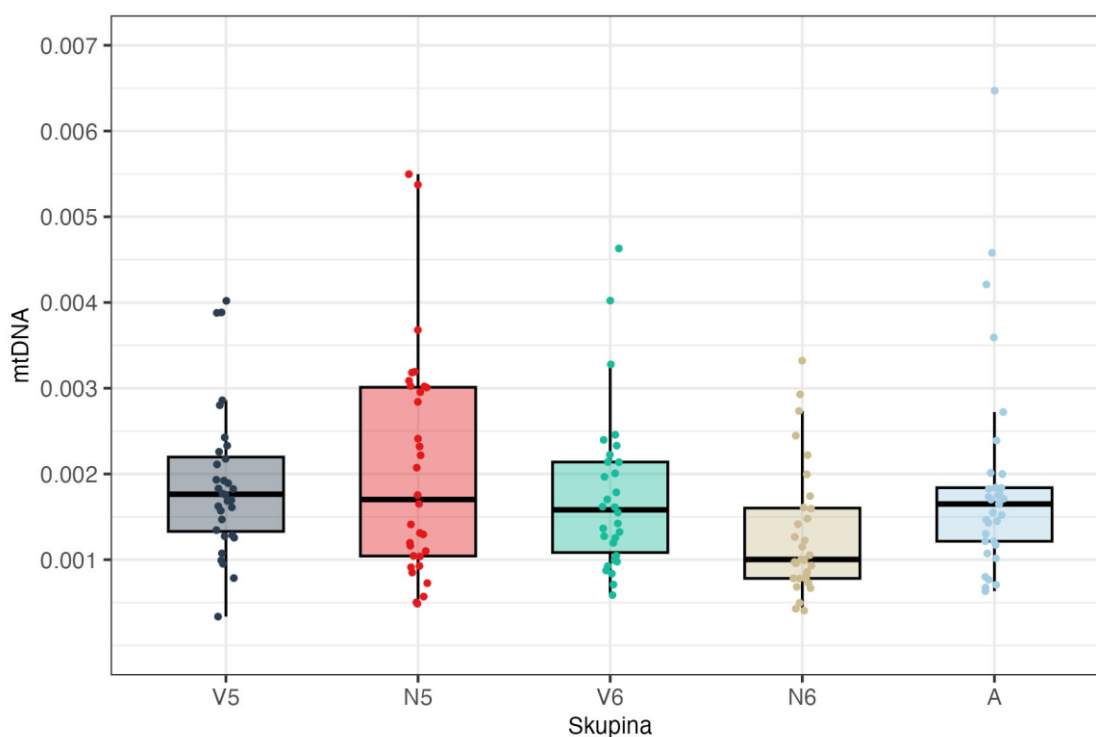
Kada su se usporedile morfokinetske ocjene zametaka prema danima razvoja, skupine se nisu značajno razlikovale u ocjeni zametka u drugom danu razvoja ( $p = 0,295$ ). Međutim, pronađena je značajna razlika između analiziranih skupina u ocjeni zametka u trećem danu razvoja ( $p = 0,012$ ), pri čemu su niskokvalitetne blastociste imale značajno nižu ocjenu trećeg dana razvoja od visokokvalitetnih blastocista (skupine N5 + N6 vs. V5 + V6, medijani 1,5 i 2,  $p = 0,011$ ). Nadalje, pronađena je značajna razlika u kompaktnosti zametka u četvrtom danu između analiziranih skupina, pri čemu su zameci koji su se razvili u blastocistu u petom danu pokazivali značajno veću kompaktnost od zametaka koji su se razvili u blastocistu u šestom danu (V5 + N5 vs. V6 + N6, medijani 1 i 0,5,  $p < 0,001$ ). Aneuploidni zameci nisu imali značajno različitu ocjenu zametka u trećem danu razvoja od euploidnih zametaka ( $p = 0,705$ ), kao ni značajno različitu kompaktnost od euploidnih zametaka ( $p = 0,133$ ).

**Tablica 6.** Osnovne karakteristike svih 159 analiziranih blastocista, razvrstanih u pet skupina (V5, N5, V6, N6 i A) s obzirom na ploidiju i morfološke ocjene blastocista (n = broj analiziranih blastocista u skupini, BS = broj stanica zametka, F = stupanj fragmentacije zametka, O = ocjena zametka, K = kompaktnost zametka)

| Skupina<br>(n)      | Opis                                   | Medijan (interkvartilni raspon) |             |                       |             |             |               |                  |               |                 |                  |
|---------------------|----------------------------------------|---------------------------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|---------------|------------------|---------------|-----------------|------------------|
|                     |                                        | XX n (%)                        | XY n (%)    | Dob majke<br>(godine) | Dan-2<br>BS | Dan-3<br>BS | Dan-2<br>F    | Dan-3<br>F       | Dan-2<br>O    | Dan-3<br>O      | Dan-4<br>K       |
| V5<br>(n = 32)      | Visoka kvaliteta,<br>dan-5, euploidija | 14 (43,8 %)                     | 18 (56,2 %) | 31<br>(27-33)         | 4<br>(4-5)  | 8<br>(8-10) | 0<br>(0-1)    | 0<br>(0-0,75)    | 1,5<br>(1-2)  | 1,5<br>(1-2)    | 1<br>(1-1)       |
| N5<br>(n = 32)      | Niska kvaliteta,<br>dan-5, euploidija  | 25 (78,1 %)                     | 7 (21,9 %)  | 29<br>(24-33)         | 4<br>(4-5)  | 8<br>(8-10) | 0,25<br>(0-1) | 0,25<br>(0-0,5)  | 1,75<br>(1-2) | 2<br>(1,5-2)    | 1<br>(1-1)       |
| V6<br>(n = 30)      | Visoka kvaliteta,<br>dan-6, euploidija | 15 (50,0 %)                     | 15 (50,0 %) | 30<br>(23-33)         | 4<br>(4-4)  | 8<br>(7-10) | 0<br>(0-1)    | 0<br>(0-0,5)     | 1,5<br>(1-2)  | 1,5<br>(1-2)    | 0,5<br>(0,5-0,5) |
| N6<br>(n = 31)      | Niska kvaliteta,<br>dan-6, euploidija  | 14 (45,2 %)                     | 17 (54,8 %) | 31<br>(28-34)         | 5<br>(4-6)  | 8<br>(7-10) | 0<br>(0-2)    | 0<br>(0-0,5)     | 1,5<br>(1-2)  | 2<br>(1,5-2)    | 0,5<br>(0,5-0,5) |
| A<br>(n = 34)       | dan-5/dan-6,<br>aneuploidija           | 14 (41,2 %)                     | 20 (58,8 %) | 32<br>(27,5-34)       | 4<br>(4-4)  | 8<br>(8-10) | 0<br>(0-0,5)  | 0,25<br>(0-0,75) | 1,25<br>(1-2) | 1,5<br>(1,25-2) | 0,5<br>(0,5-1)   |
| Ukupno<br>(N = 159) | Sve blastociste                        | 82 (51,6 %)                     | 77 (49,4 %) | 31<br>(25-34)         | 4<br>(4-5)  | 8<br>(8-10) | 0<br>(0-0,5)  | 0,5<br>(0-1)     | 1,5<br>(1-2)  | 1,5<br>(1,5-2)  | 1<br>(0,5-1)     |

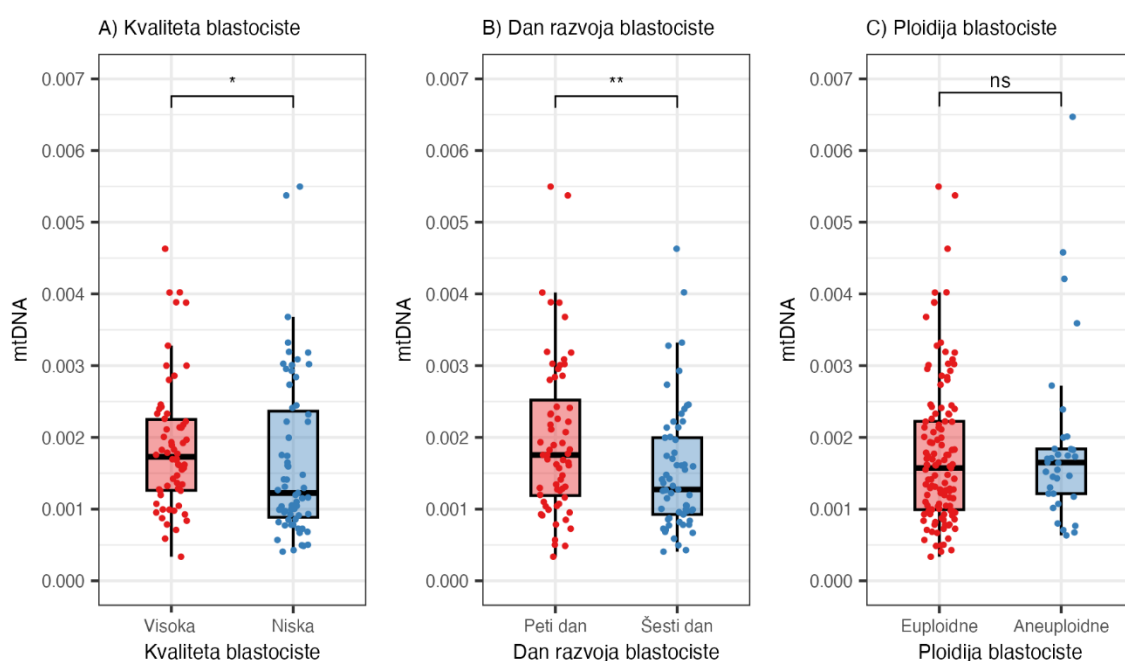
#### 4.2. Ovisnost razine mitohondrijske DNA, ploidije blastociste, morfologije blastociste i dana razvoja potpuno ekspanzirane blastociste

S obzirom da je glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati korelaciju između razina mtDNA blastociste, ploidije blastociste, morfološke kvalitete blastociste i dana razvoja potpuno ekspanzirane blastociste, na Slici 22 prikazane su razine mtDNA blastocista podijeljenih u pet skupina definiranih prema morfološkoj kvaliteti blastociste, danu razvoja blastociste i ploidiji. Uočena je značajna razlika u razini mtDNA u analiziranim skupinama ( $p = 0,016$ ). Preciznije, skupina N6 pokazala je značajno nižu razinu mtDNA od skupina V5 (medijani 0,0010 i 0,0018,  $p = 0,006$ ), N5 (medijani 0,0010 i 0,0017,  $p = 0,008$ ), V6 (medijani 0,0010 i 0,0016,  $p = 0,003$ ) i skupine A (medijani 0,0010 i 0,0017,  $p = 0,012$ ).



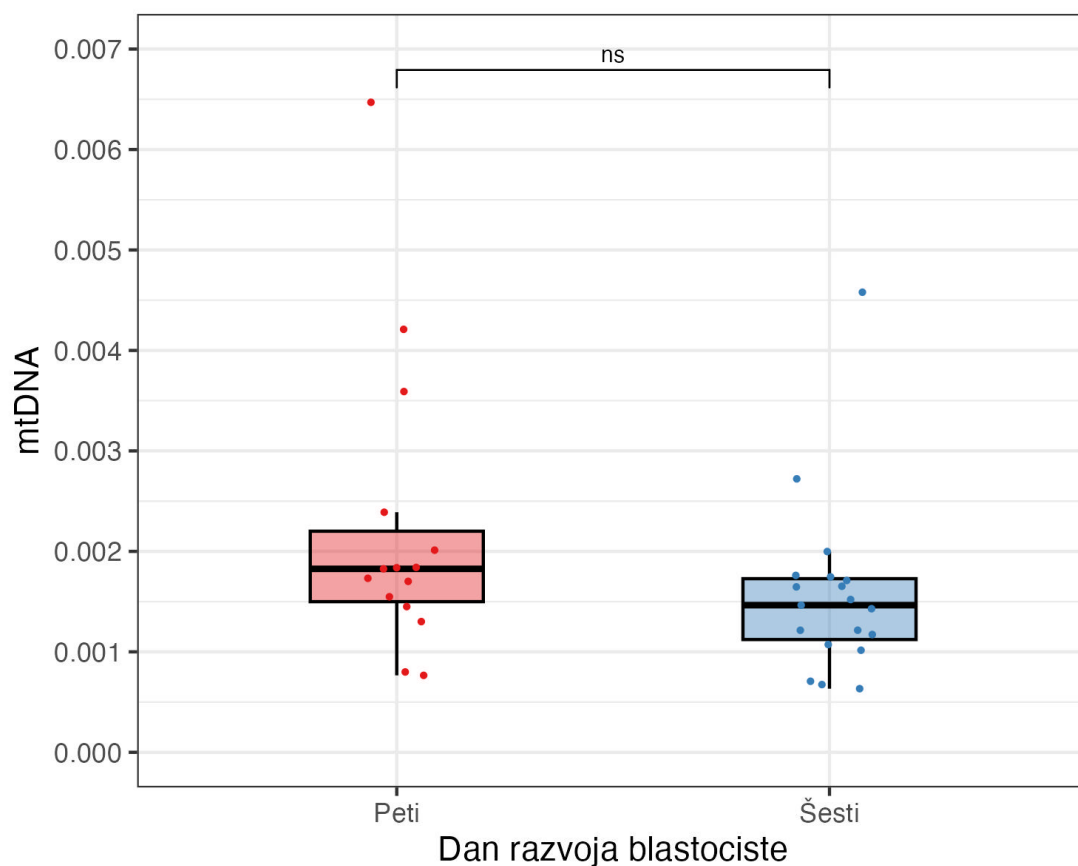
**Slika 22.** Razina mitohondrijske DNA u analiziranim skupinama blastocista. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

Na Slici 23 prikazana je usporedba razina mtDNA između visokokvalitetnih i niskokvalitetnih blastocista (N5 + N6 vs. V5 + V6; Slika 23A), blastocista formiranih u petom i šestom danu razvoja (N5 + V5 vs. N6 + V6; Slika 23B) te euploidnih i aneuploidnih blastocista (Slika 23C). Visokokvalitetne blastociste imale su višu razinu mtDNA od niskokvalitetnih blastocista (medijani 0,0017 i 0,0012,  $p = 0,049$ ). Slično, blastociste formirane u petom danu razvoja pokazivale su značajno veće razine mtDNA od blastocista formiranih u šestom danu razvoja (medijani 0,0018 i 0,0013,  $p = 0,009$ ). S druge strane, nije pronađena značajna razlika u razinama mtDNA u euploidnim i aneuploidnim blastocistama ( $p = 0,710$ ).



**Slika 23.** Razina mitohondrijske DNA s obzirom na A) kvalitetu blastocista, B) dana razvoja potpuno ekspanzirane blastociste i C) ploidiju blastocista. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ , ns (nije značajan, *engl.* non-significant):  $p > 0,05$

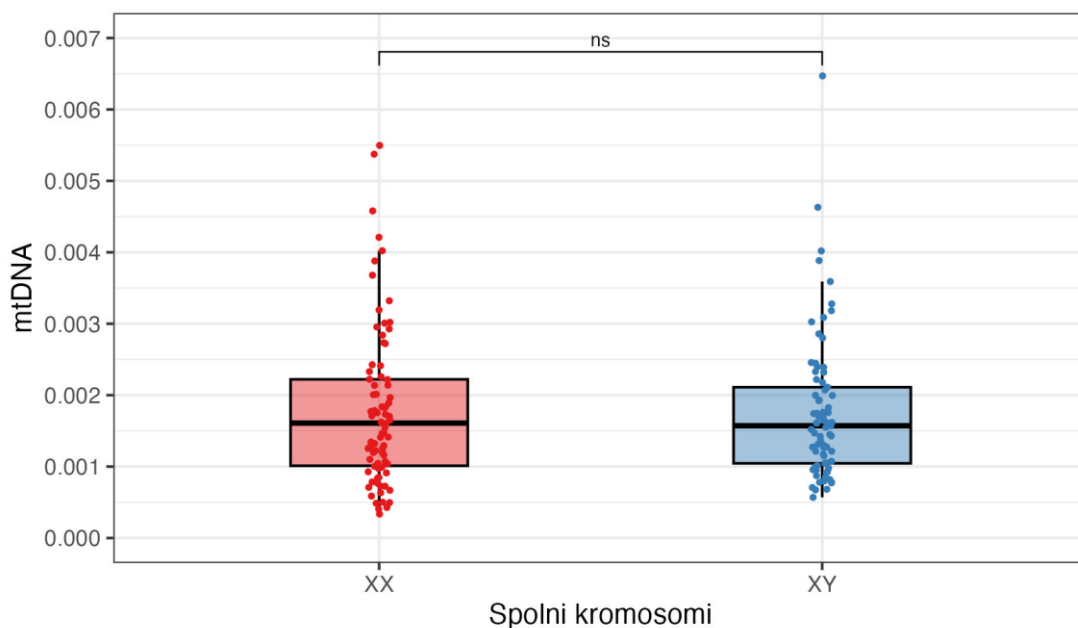
Naposljetku, uspoređena je i razina mtDNA kod aneuploidnih blastocista formiranih u petom i šestom danu (Slika 24), pri čemu nije pronađena značajna razlika u razini mtDNA u navedenim skupinama (medijani 0,0018 i 0,0015,  $p = 0,110$ ).



**Slika 24.** Razina mitohondrijske DNA aneuploidnih blastocista s obzirom na dan razvoja potpuno ekspanzirane blastociste. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. ns (nije značajan):  $p > 0,05$

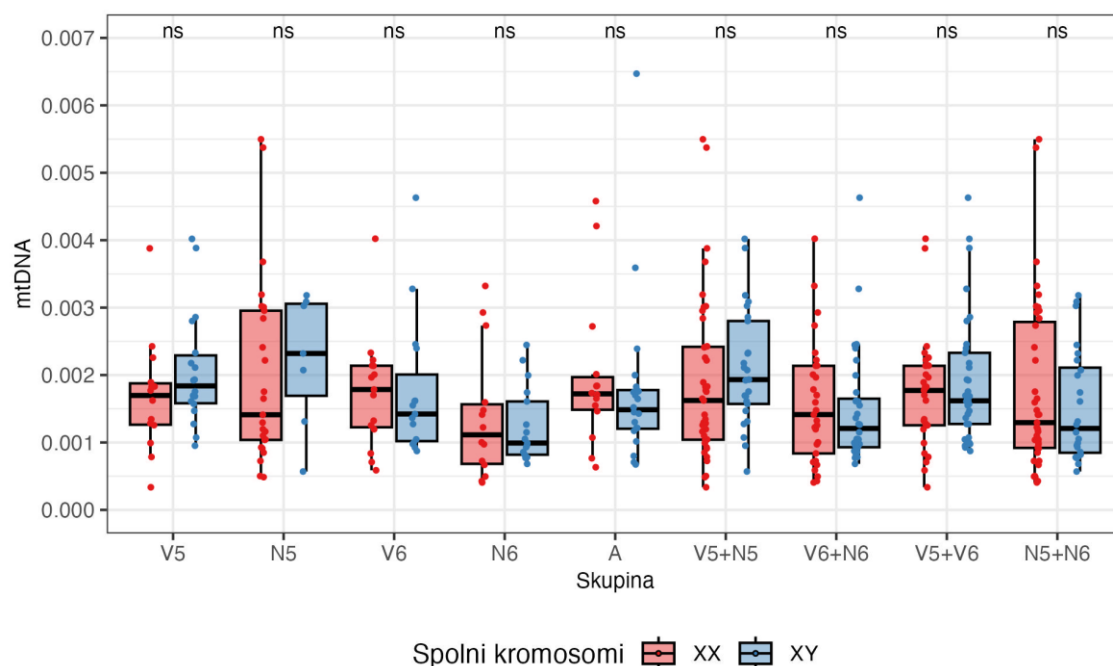
#### 4.3. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o spolnim kromosomima zametka

U ovom istraživanju analizirali smo i potencijalnu ovisnost razine mtDNA blastociste i spolnih kromosoma zametka (Slika 25). Promatrajući sve zametke zajedno, nije utvrđena značajna razlika u razinama mtDNA kod zametaka s kromosomima XX i XY ( $p = 0,974$ , Slika 25).



**Slika 25.** Razina mitohondrijske DNA blastocista s obzirom na spolne kromosome. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. ns (nije značajan):  $p > 0,05$

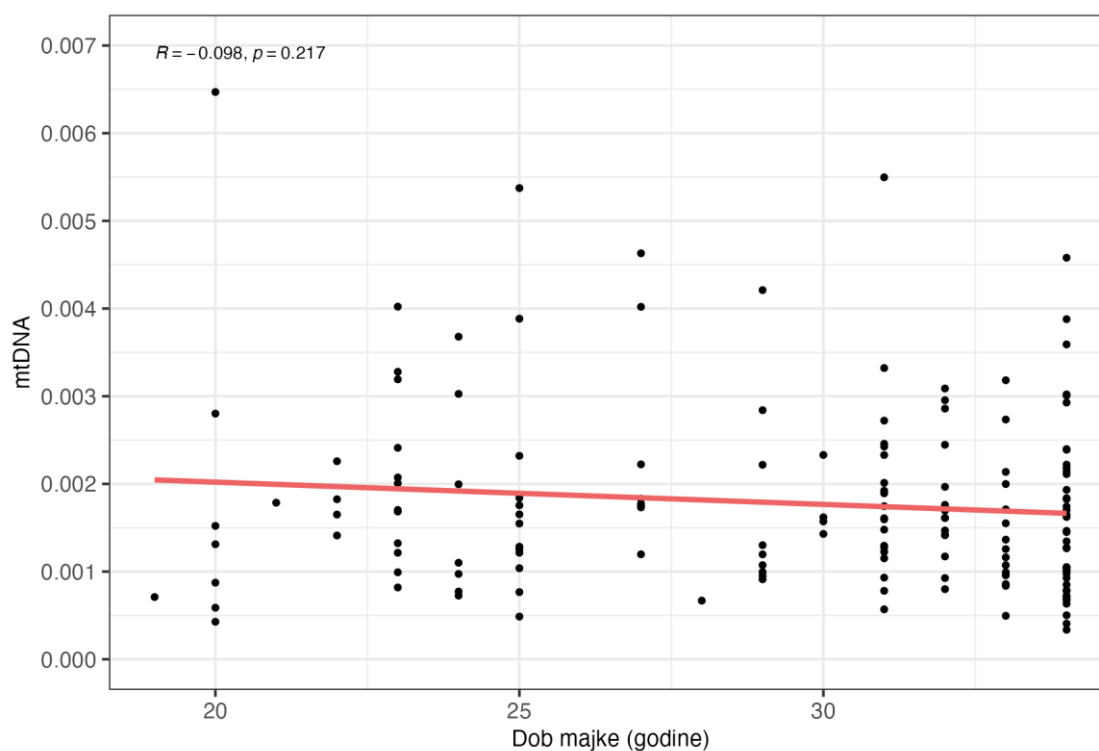
Promatrajući skupine blastocista pojedinačno (Slika 26), nije utvrđena značajna razlika u razinama mtDNA u zamecima s kromosomima XX i XY ni u jednoj od analiziranih skupina (V5:  $p = 0,235$ , N5:  $p = 0,370$ , V6:  $p = 0,838$ , N6:  $p = 0,992$ , A:  $p = 0,306$ ). Blastociste s kromosomima XX i XY nisu pokazale značajnu razliku u razini mtDNA kod visokokvalitetnih blastocista (skupina V5 + V6,  $p = 0,585$ ), niskokvalitetnih blastocista (N5 + N6,  $p = 0,710$ ), blastocista formiranih u petom danu razvoja (V5 + N5,  $p = 0,131$ ) ni kod blastocista formiranih u šestom danu razvoja (V6 + N6,  $p = 0,780$ ).



**Slika 26.** Razina mitohondrijske DNA blastocista s obzirom na spolne kromosome zametka u skupinama blastocista definiranim kvalitetom, danom razvoja potpuno ekspanzirane blastociste i ploidijom. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. ns (nije značajan):  $p > 0,05$ . V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

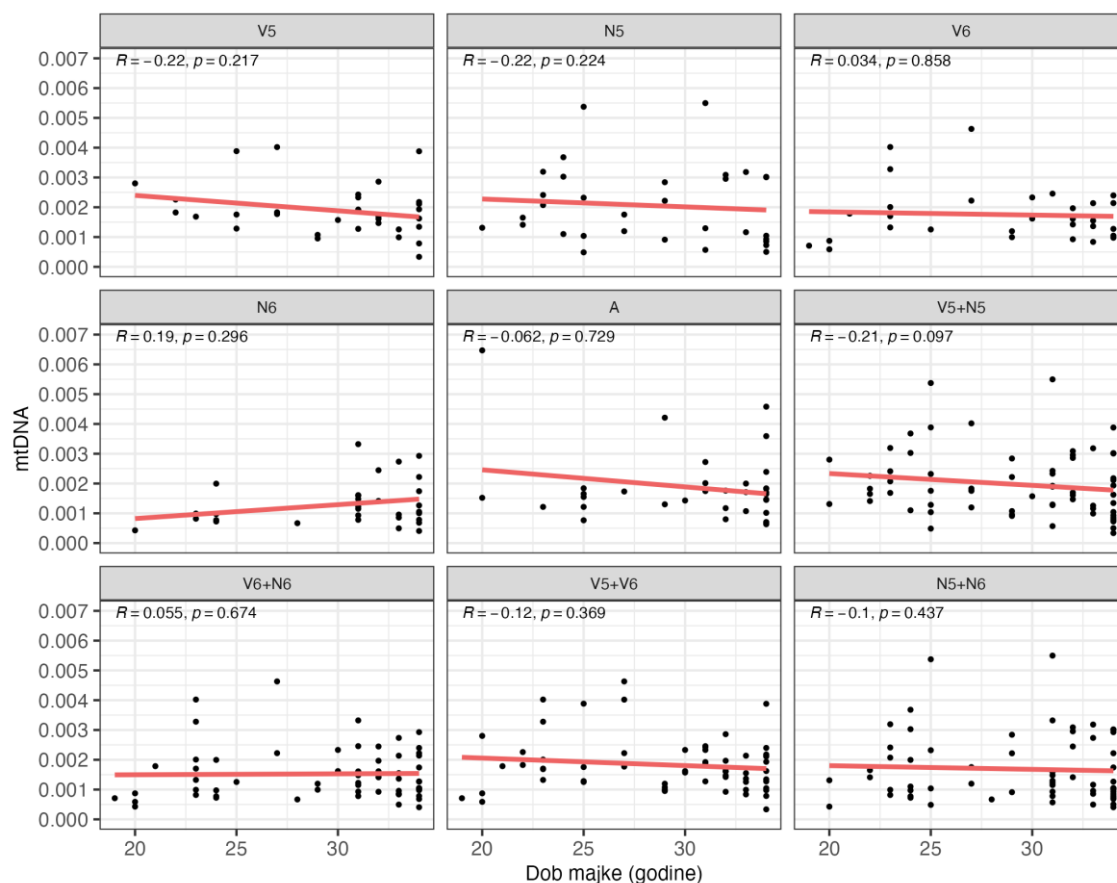
#### 4.4. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste i dobi majke

Analizirana je potencijalna ovisnost razine mtDNA blastociste i dobi majke (19 – 34 godina). Uzimajući u obzir sve zametke, nije pronađena značajna korelacija između mtDNA i dobi majke ( $R = -0,01$ ,  $p = 0,217$ , Slika 27).



**Slika 27.** Korelacija razine mitohondrijske DNA blastociste s dobi majke. R = Spearmanov korelacijski koeficijent

Promatrajući skupine blastocista zasebno (Slika 28), nije utvrđena značajna korelacija između dobi majke i razina mtDNA blastociste ni u jednoj od analiziranih skupina (V5:  $R = -0,22$ ,  $p = 0,22$ , N5:  $R = -0,22$ ,  $p = 0,224$ , V6:  $R = 0,03$ ,  $p = 0,858$ , N6:  $R = 0,19$ ,  $p = 0,296$ , A:  $R = -0,06$ ,  $p = 0,729$ ). Značajna korelacija između razina mtDNA i dobi majke nije pronađena ni kada se zajedno promatraju blastociste formirane u petom danu razvoja (skupina V5 + N5,  $R = -0,21$ ,  $p = 0,097$ ), blastociste formirane u šestom danu razvoja (V6 + N6,  $R = 0,06$ ,  $p = 0,674$ ), visokokvalitetne blastociste (V5 + V6,  $R = -0,12$ ,  $p = 0,369$ ) ni niskokvalitetne blastociste (N5 + N6,  $R = -0,10$ ,  $p = 0,437$ ).

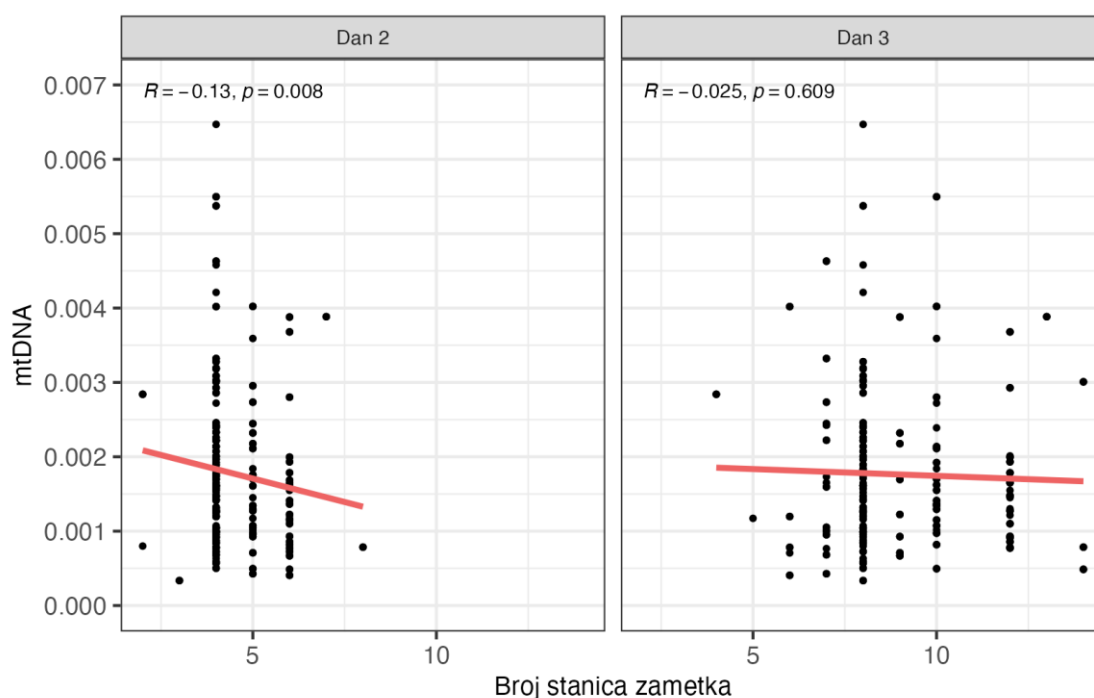


**Slika 28.** Korelacija razine mitohondrijske DNA blastociste s dobi majke u skupinama blastocista definiranim kvalitetom blastociste, danom razvoja potpuno ekspanzirane blastociste i ploidijom blastociste. R = Spearmanov korelacijski koeficijent. V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

#### 4.5. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o broju stanica staničnih stadija zametka

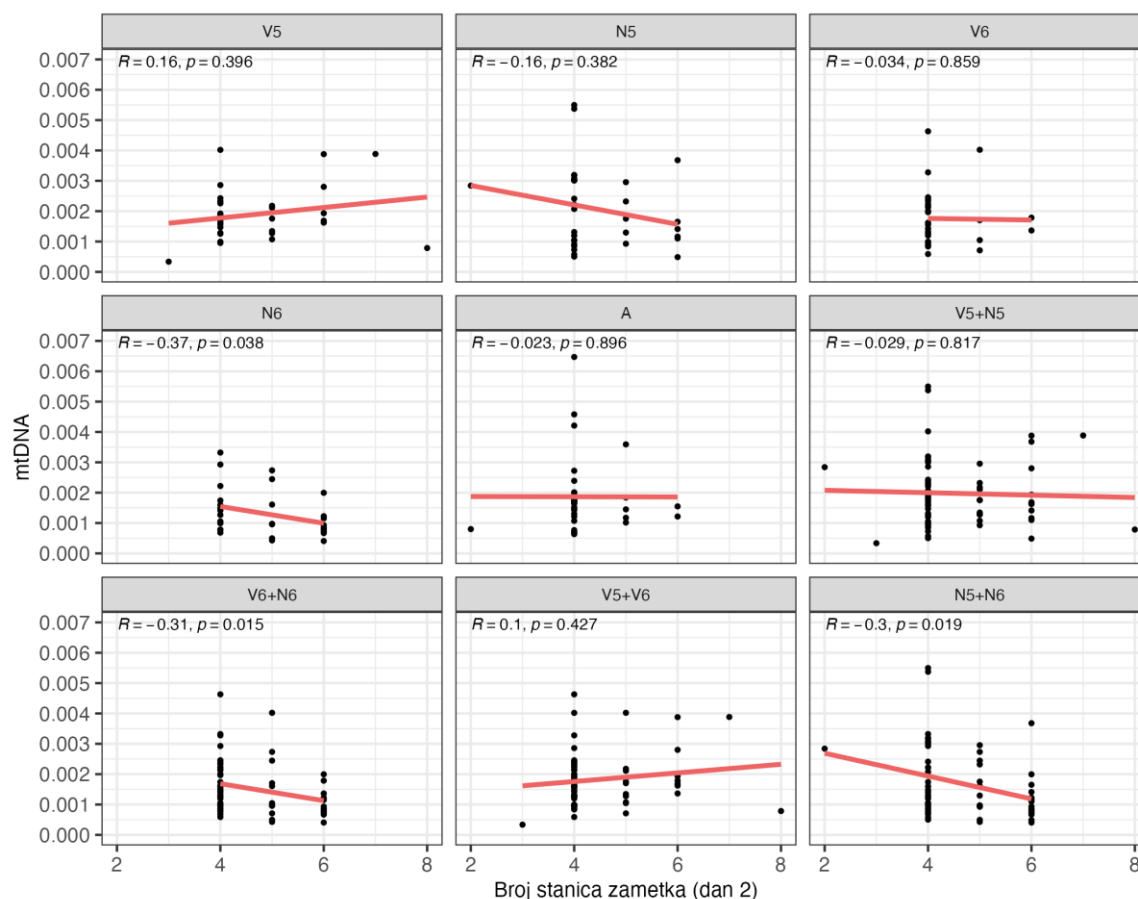
U sljedećem dijelu istraživanja analizirana je korelacija između razine mtDNA blastociste i broja stanica u ranijim fazama razvoja zametka. Pri analizi svih blastocista (Slika 29), utvrđena je slaba negativna korelacija između razina mtDNA blastociste i broja stanica zametka u drugom danu razvoja ( $R = -0,13$ ,  $p = 0,008$ ). S druge strane, nije utvrđena

značajna korelacija između razina mtDNA blastociste i broja stanica zametka u trećem danu razvoja ( $R = -0,03$ ,  $p = 0,609$ ).



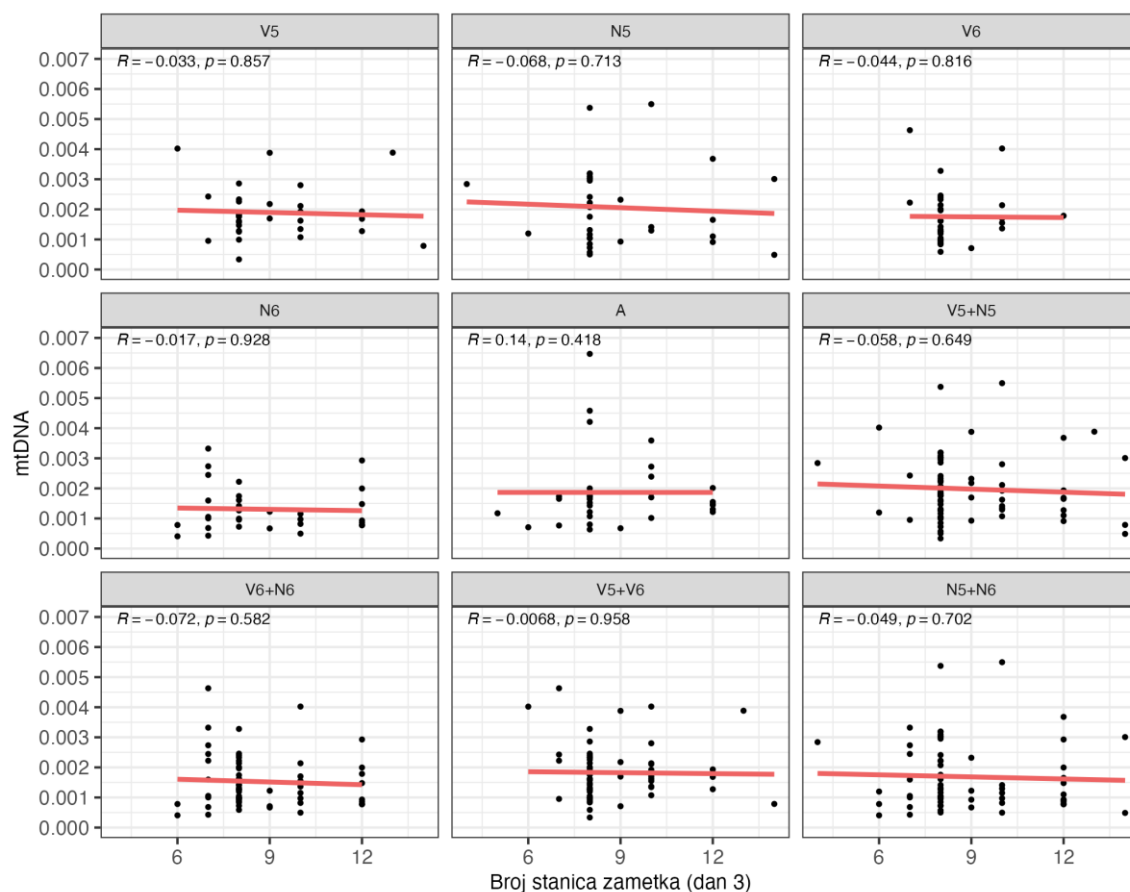
**Slika 29.** Korelacija razine mitohondrijske DNA blastociste s brojem stanica zametka u drugom i trećem danu.  $R$  = Spearmanov korelacijski koeficijent

Promatrajući skupine blastocista pojedinačno, nekoliko skupina pokazalo je značajnu negativnu korelaciju razina mtDNA s brojem stanica u drugom danu razvoja (Slika 30). Navedene skupine uključuju skupinu N6 ( $R = -0,37$ ,  $p = 0,038$ ), dan-6 blastocista (skupina V6 + N6,  $R = -0,31$ ,  $p = 0,015$ ) i niskokvalitetne blastociste (N5 + N6,  $R = -0,30$ ,  $p = 0,019$ ). U ostalim analiziranim skupinama nije pronađena značajna korelacija između razina mtDNA i broja stanica zametka u drugom danu razvoja (V5:  $R = 0,16$ ,  $p = 0,396$ , N5:  $R = -0,16$ ,  $p = 0,382$ , V6:  $R = -0,03$ ,  $p = 0,859$ , A:  $R = -0,02$ ,  $p = 0,896$ , V5 + N5:  $R = -0,03$ ,  $p = 0,817$  i V5 + V6:  $R = 0,10$ ,  $p = 0,427$ ).



**Slika 30.** Korelacija razine mitohondrijske DNA blastociste s brojem stanica zametka u drugom danu razvoja u skupinama blastocista definiranim kvalitetom, danom razvitka i ploidijom.  $R$  = Spearmanov korelacijski koeficijent. V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

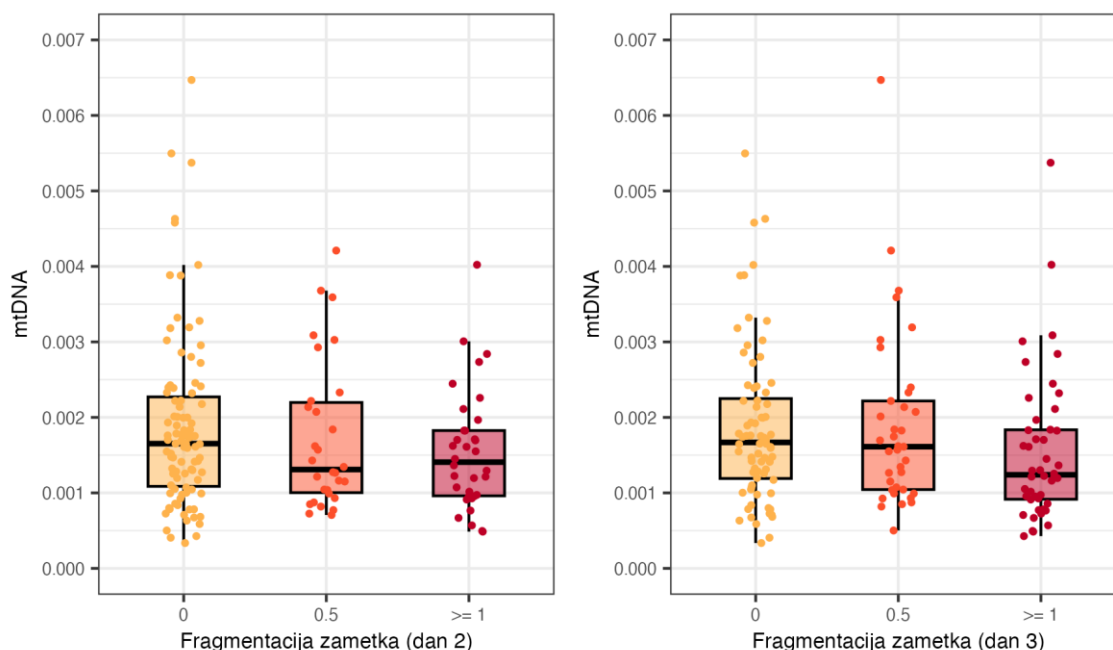
S druge strane, nijedna od analiziranih skupina nije pokazala značajnu korelaciju između razina mtDNA i broja stanica zametka u trećem danu razvoja (Slika 31) (V5:  $R = -0,03$ ,  $p = 0,857$ , N5:  $R = -0,09$ ,  $p = 0,713$ , V6:  $R = -0,04$ ,  $p = 0,816$ , N6:  $R = -0,02$ ,  $p = 0,928$ , A:  $R = 0,14$ ,  $p = 0,418$ ). Značajna korelacija između razina mtDNA i broja stanica zametka u trećem danu razvoja nije pronađena u blastocistama formiranim u petom danu (skupina V5 + N5,  $R = -0,06$ ,  $p = 0,649$ ), blastocistama formiranim u šestom danu (V6 + N6,  $R = -0,07$ ,  $p = 0,852$ ), visokokvalitetnim blastocistama (V5 + V6,  $R = -0,01$ ,  $p = 0,958$ ) ni u niskokvalitetnim blastocistama (N5 + N6,  $R = -0,05$ ,  $p = 0,702$ ).



**Slika 31.** Korelacija razine mitohondrijske DNA blastociste s brojem stanica zametka u trećem danu razvoja u skupinama blastocista definiranim kvalitetom blastociste, danom razvoja potpuno ekspanzirane blastociste i ploidijom blastociste.  $R$  = Spearmanov korelacijski koeficijent. V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

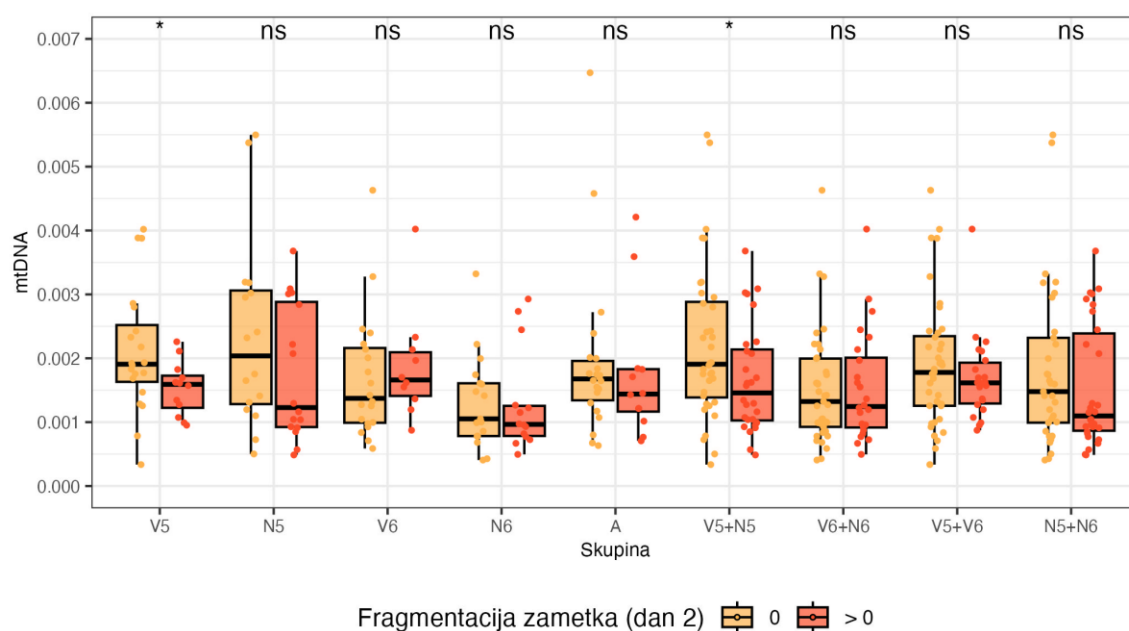
#### 4.6. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o stupnju fragmentacije zametka

Analizirana je ovisnost razina mtDNA blastociste o stupnju fragmentacije ranih zametka u drugom i trećem danu razvoja. Nije utvrđena značajna razlika u razinama mtDNA blastociste u zamecima sa stupnjevima fragmentacije 0, 0,5 i 1 u drugom danu razvoja ( $p = 0,232$ ) ni u trećem danu razvoja ( $p = 0,145$ , Slika 32).



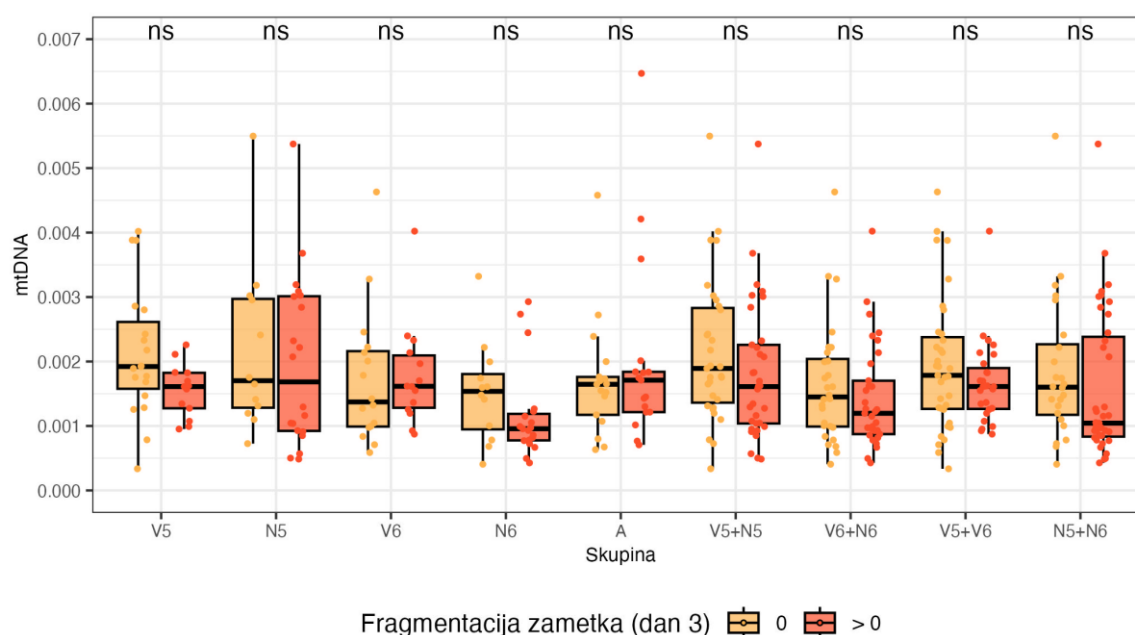
**Slika 32.** Usporedba razina mitohondrijske DNA blastociste kod zametaka s različitim stupnjem fragmentacije u drugom danu (lijevo) i trećem danu razvoja (desno). Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste

Promatrajući skupine blastocista zasebno (Slika 33), blastociste skupine V5 pokazale su značajno veće razine mtDNA kod nefragmentiranih zametaka u usporedbi s fragmentiranim zamecima u drugom danu razvoja (medijani 0,0019 i 0,0015,  $p = 0,040$ ). Ostale skupine nisu pokazale spomenutu razliku (N5:  $p = 0,187$ , V6:  $p = 0,455$ , N6:  $p = 0,662$ , A:  $p = 0,310$ ). Blastociste formirane u petom danu razvoja također su pokazale značajno veće razine mtDNA kod fragmentiranih ranih zametaka u drugom danu razvoja (skupina V5 + N5, medijani 0,0020 i 0,0014,  $p = 0,038$ ). Navedena razlika nije pronađena u blastocistama formiranim šesti dan (V6 + N6,  $p = 0,976$ ), visokokvalitetnim blastocistama (V5 + V6,  $p = 0,462$ ) ni niskokvalitetnim blastocistama (N5 + N6,  $p = 0,302$ ).



**Slika 33.** Usporedba razine mitohondrijske DNA kod zametaka s različitim stupnjem fragmentacije u drugom danu u skupinama blastocista definiranim kvalitetom blastociste, danom razvoja potpuno ekspanzirane blastociste i ploidijom blastociste. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. \*:  $p < 0,05$ , ns (nije značajan):  $p > 0,05$ . V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

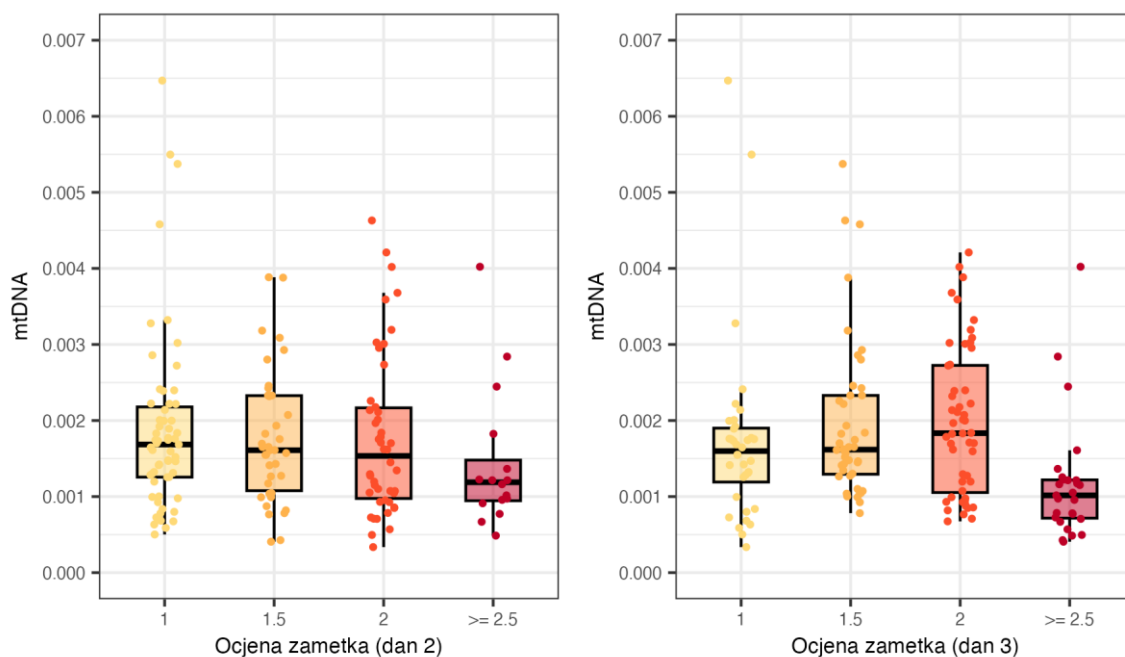
S druge strane, nijedna od analiziranih skupina blastocista nije pokazala značajnu razliku u razinama mtDNA kod fragmentiranih i nefragmentiranih zametaka u trećem danu razvoja (Slika 34). Navedeno vrijedi za skupinu V5 ( $p = 0,053$ ), V6 ( $p = 0,460$ ), N5 ( $p = 0,618$ ), N6 ( $p = 0,123$ ) i A ( $p = 0,912$ ). Spomenuta razlika nije pronađena ni kod blastocista formiranim u petom danu razvoja (skupina V5 + N5,  $p = 0,138$ ), blastocista formiranim u šestom danu razvoja (V6 + N6,  $p = 0,304$ ), visokokvalitetnim blastocistama (V5 + V6,  $p = 0,338$ ) ni u niskokvalitetnim blastocistama (N5 + N6,  $p = 0,113$ ).



**Slika 34.** Usporedba razine mitohondrijske DNA kod zametaka s različitim stupnjem fragmentacije u trećem danu razvoja u skupinama blastocista definiranim kvalitetom, danom razvitka i ploidijom. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. ns (nije značajan):  $p > 0,05$ . V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

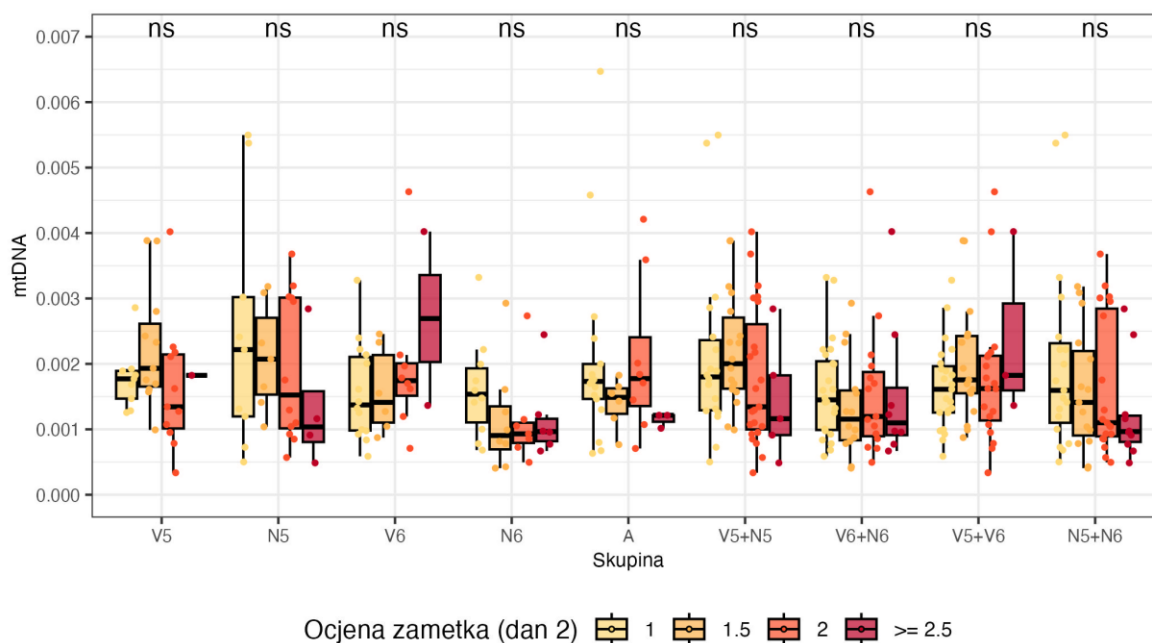
#### 4.7. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o morfološkoj ocjeni staničnih stadija zametka

U ovom istraživanju analizirana je i ovisnost razina mtDNA blastociste o morfološkoj ocjeni zametka u drugom i trećem danu razvoja. Promatrajući sve zametke, nije pronađena značajna razlika u razinama mtDNA blastociste kod zametaka s ocjenama 1, 1,5, 2 i 2,5 u drugom danu razvoja ( $p > 0,05$ ). S druge strane, zameci s ocjenom 2,5 ili 3 u trećem danu razvoja pokazivali su niže razine mtDNA blastociste od zametaka s manjom ocjenom (medijani 0,00010 i 0,0016,  $p < 0,001$ ) (Slika 35).



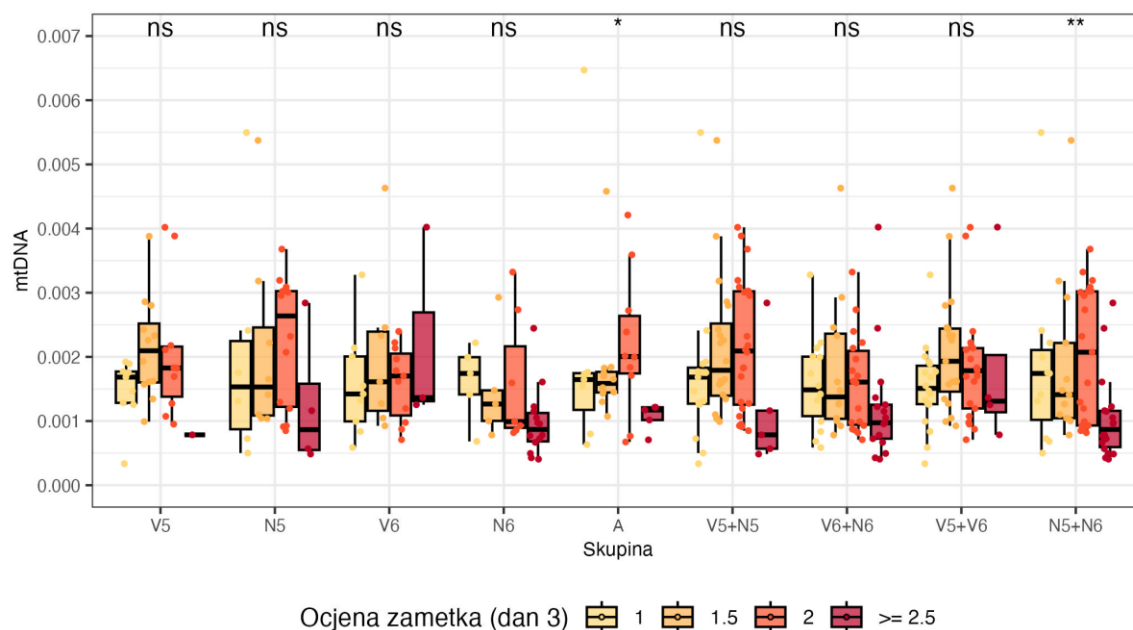
**Slika 35.** Usporedba razina mitohondrijske DNA blastociste kod zametaka s različitim morfološkim ocjenama u drugom danu (lijevo) i trećem danu razvoja (desno). Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste

Nadalje, nijedna od analiziranih skupina blastocista nije pokazivala značajnu ovisnost između razina mtDNA blastociste i morfološke ocjene zametka u drugom danu razvoja (Slika 36). Navedeno uključuje skupine V5 ( $p = 0,359$ ), N6 ( $p = 0,471$ ), V6 ( $p = 0,690$ ), N6 ( $p = 0,329$ ) i A ( $p = 0,279$ ). Blastociste formirane u petom danu razvoja također nisu pokazale značajnu ovisnost razina mtDNA i morfološke ocjene zametka u drugom danu razvoja (skupina V5 + N5,  $p = 0,229$ ). Navedeno vrijedi i za blastociste formirane u šestom danu razvoja (V6 + N6,  $p = 0,723$ ), visokokvalitetne blastociste (V5 + V6,  $p = 0,488$ ) te niskokvalitetne blastociste (N5 + N6,  $p = 0,371$ ).



**Slika 36.** Usporedba razina mitohondrijske DNA blastociste kod zametaka s različitim morfološkim ocjenama u drugom danu razvoja u skupinama blastocista definiranim kvalitetom blastociste, danom razvoja potpuno ekspanzirane blastociste i ploidijom blastociste. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. ns (nije značajan):  $p > 0,05$ . V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

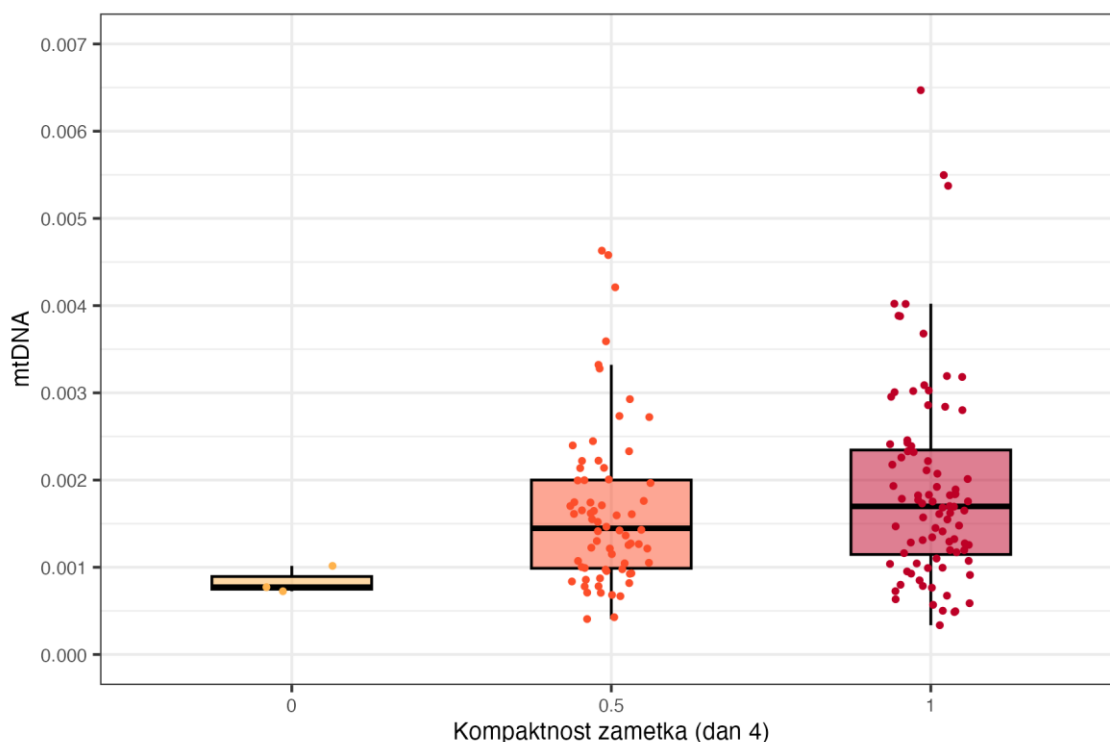
Slično, nijedna od zasebnih skupina blastocista nije pokazala značajnu ovisnost između razina mtDNA i morfoloških ocjena zametka u trećem danu razvoja (Slika 37). Navedeno uključuje skupine V5 ( $p = 0,138$ ), N5 ( $p = 0,320$ ), V6 ( $p = 0,844$ ), N6 ( $p = 0,120$ ) i A ( $p = 0,112$ ). S druge strane, blastociste formirane u šestom danu razvoja pokazivale su značajne razlike u razinama mtDNA s obzirom na morfološku ocjenu zametka u trećem danu razvoja. Konkretno, niskokvalitetne blastociste s morfološkom ocjenom većom ili jednakom 2,5 imale su značajno niže razine mtDNA od ostalih niskokvalitetnih blastocista (skupina N5+N6, medijani 0,0009 i 0,0016,  $p = 0,006$ ). Navedena ovisnost nije pronađena kod visokokvalitetnih blastocista (V5 + V6,  $p = 0,268$ ), blastocista formiranih peti dan (V5 + N5,  $p = 0,068$ ) i blastocista formiranih šesti dan (V6 + N6,  $p = 0,268$ ).



**Slika 37.** Usporedba razina mitohondrijske DNA blastociste kod zametaka s različitim morfološkim ocjenama u trećem danu razvoja u skupinama blastocista definiranim kvalitetom blastociste, danom razvoja potpuno ekspanzirane blastociste i ploidijom blastociste. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , ns (nije značajan):  $p > 0,05$ . V5 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, N5 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u petom danu razvoja, V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

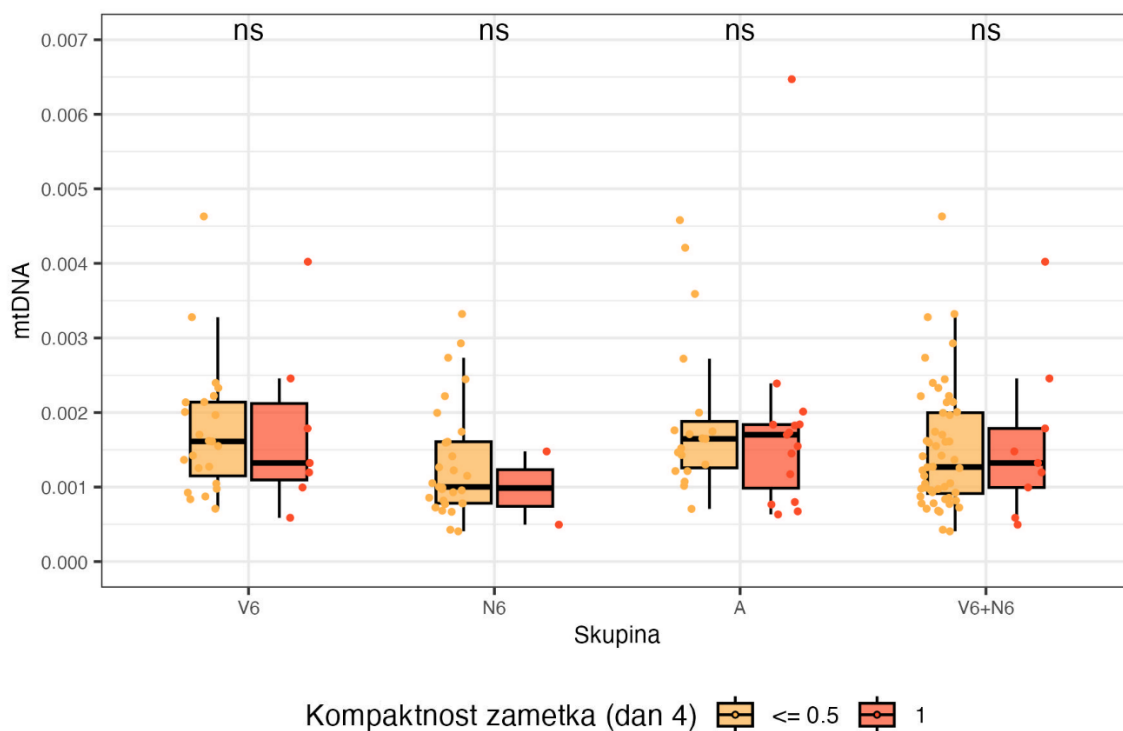
#### 4.8. Ovisnost razine mitohondrijske DNA blastociste o stupnju kompakcije zametka

U ovom istraživanju ispitana je i ovisnost razina mtDNA blastociste o stupnju kompakcije zametka u četvrtom danu razvoja. Blastociste s ocjenom kompaktnosti 0 u četvrtom danu razvoja imale su značajno niže razine mtDNA od ostalih blastocista (medijani 0,0007 i 0,0016,  $p = 0,036$ ). S druge strane, nije pronađena značajna razlika u razinama mtDNA kod blastocista s ocjenom kompaktnosti 0,5 i 1 u četvrtom danu razvoja ( $p = 0,138$ ; Slika 38).



**Slika 38.** Usporedba razine mitohondrijske DNA blastociste kod zametaka s različitom kompaktnošću u četvrtom danu razvoja. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste

Navedena korelacija analizirana je i zasebno u svim skupinama blastocista (Slika 39). Pritom, u navedenu analizu nisu uključene blastociste formirane peti dan s obzirom da su sve navedene blastociste u četvrtom danu razvoja imale ocjenu kompaktnosti 1. Nijedna od analiziranih skupina nije pokazala značajnu ovisnost između razina mtDNA blastociste i kompaktnosti zametka u četvrtom danu (V6:  $p = 0,832$ , N6:  $0,569$ , A:  $p = 0,665$ ). Također, navedena ovisnost nije pronađena ni kod svih blastocista formiranih u šestom danu (skupina V6 + N6,  $p = 0,943$ ).

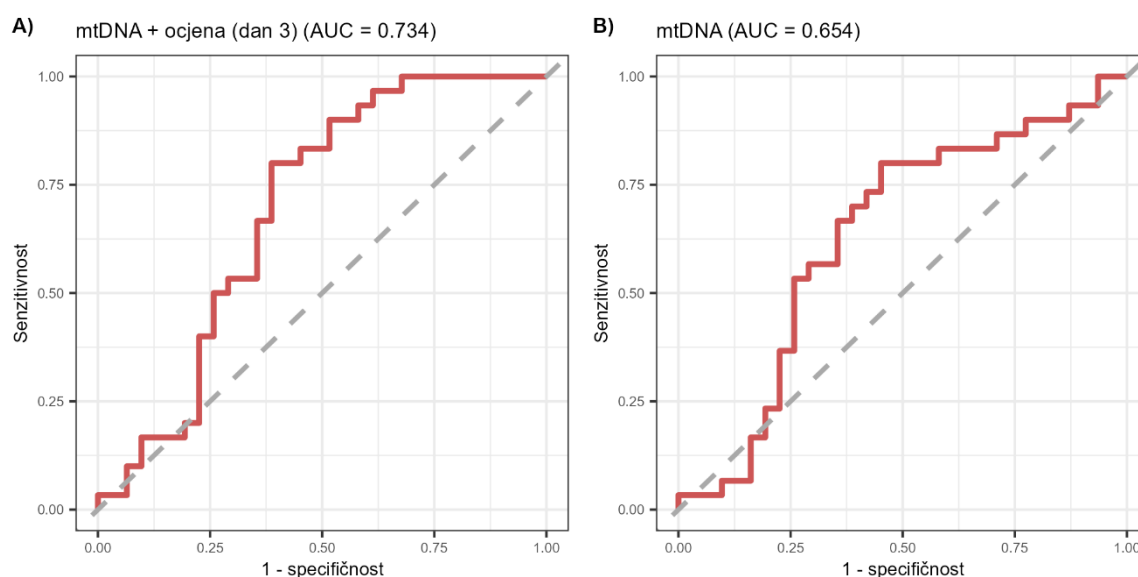


**Slika 39.** Usporedba razine mitohondrijske DNA blastociste kod zametaka s različitom kompaktnošću u četvrtom danu razvoja u blastocistama formiranim u šestom danu razvoja i aneuploidnim blastocistama. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, a pravokutnici se protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice označavaju individualne blastociste. ns (nije značajan):  $p > 0,05$ . V6 = visokokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, N6 = niskokvalitetne euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja, A = aneuploidne blastociste

#### 4.9. Klasifikacija niskokvalitetnih blastocista pomoću razina mitohondrijske DNA

Naposljetku, analiziran je i potencijal razina mtDNA blastociste za klasifikaciju niskokvalitetnih blastocista. Pritom, uzete su euploidne blastociste formirane u šestom danu razvoja budući da blastociste formirane u petom danu razdoblja nisu pokazale značajnu korelaciju između razina mtDNA i kvalitete blastociste. Kao mogući prediktori za kvalitetu blastociste ispitani su svi dostupni parametri zametka. Model koji je najpreciznije klasificirao blastociste po kvaliteti koristio je dva prediktora: razinu mtDNA blastociste i morfološku ocjenu zametka u trećem danu razvoja. Prema navedenom modelu, udvostručenje razina mtDNA blastociste smanjuje izgleda za niskokvalitetnu blastocistu 3,43 puta (95 % CI 1,49-12,58,  $p = 0,0031$ ), pri čemu se ne uzima u obzir utjecaj

morfološke ocjene zametaka u trećem danu razvoja na kvalitetu blastociste. Također, smanjenje morfološke ocjene zametka u trećem danu razvitka za 1 povećalo bi izgleda za niskokvalitetnu blastocistu 3,52 puta (95 % CI 1,24 – 11,80,  $p = 0,025$ ), pri čemu se ignorira utjecaj razine mtDNA blastociste na kvalitetu blastociste. Navedeni model imao je preciznost od 63,7 % (senzitivnost 67,3 %, specifičnost 61,1 %) i mjeru AUC od 0,734 (95 % CI 0,630-0,837, Slika 40) pri predviđanju niskokvalitetnih blastocista. Model za klasifikaciju niskokvalitetnih blastocista koji kao jedini prediktor sadrži razinu mtDNA blastociste pokazao je preciznost od 61,9 % (senzitivnost 65,7 %, specifičnost 57,7 %), s mjerom AUC od 0,654 (95 % CI 0,535 - 0,773). Pritom, granična vrijednost razine mtDNA blastociste za klasifikaciju niskokvalitetnih blastocista bila je 0,0012. Kada se kao prediktor za niskokvalitetne blastociste koristila isključivo morfološka ocjena zametka u trećem danu razvoja, navedeni model dosegao je preciznost od 61,0 % (specifičnost 61,8 %, senzitivnost 60,0 %), s AUC mjerom od 0,658 (95 % CI 0,520 - 0,786).



**Slika 40.** Krivulje ROC modela za predviđanje niskokvalitetnih blastocista formiranih u šestom danu razvoja koristeći A) razine mtDNA blastociste i ocjenu zametka u trećem danu razvoja i B) isključivo razine mtDNA blastociste. AUC = površina ispod krivulje

## 5. RASPRAVA

Znanstvena istraživanja mtDNA u ljudskim oocitama i zamecima došla su u fokus tek u posljednja dva desetljeća. Rana istraživanja koja su proučavala važnost mtDNA u ljudskoj reprodukciji usmjerila su se na utjecaj količine mtDNA u oocitama i ishode oplodnje, otkrivajući niže razine mtDNA u neoplođenim oocitama (Reynier i sur. 2001; Van Blerkom i sur. 1995). Suboptimalna količina mtDNA u oocitama povezana je s ovarijskom insuficijencijom i poodmaklom reproduktivnom dobi majke (May-Panloup i sur. 2005), dok visokokvalitetne oocyte s optimalnim brojem mitohondrija pokazuju viši reproduktivni potencijal (Chappel 2013; Van Blerkom i sur. 1995). Nakon oplodnje, zametak ovisi o funkciji postojećih mitohondrija i mtDNA naslijeđenih iz oocyte. Odsutnost replikacije mtDNA u zamecima, po trenutnim saznanjima, traje od trenutka oplodnje do stadija predimplantacijske blastociste. Tijekom ovog razdoblja, mtDNA se raspodjeljuje među sestrinskim stanicama te se broj kopija mtDNA po stanici smanjuje, sve dok se replikacija mtDNA ne nastavi kada embrionalne stanice iniciraju diferencijaciju (Chappel 2013; Mertens i sur. 2022; St John i sur. 2010; St John 2014, Thundathil i sur. 2005).

Primarna svrha PGT-A je provjera ploidnosti zametaka stvorenih u IVF postupcima. Međutim, značajan udio euploidnih zametaka ne rezultira uspješnim trudnoćama, što upućuje na to da euploidija sama po sebi ne uvjetuje vijabilnost zametka (Luo i sur. 2023). Osim analize ploidnosti, PGT-A omogućuje i kvantifikaciju mtDNA, čime mtDNA postaje mogući dodatni biomarker procjene razvojnog potencijala zametaka nastalih IVF postupcima. Studije koje su istraživale ulogu mtDNA u predimplantacijskom razvoju ljudskih zametaka ukazale su na povezanost neoptimalnih razina mtDNA i smanjene ovarijske rezerve, poodmakle reproduktivne dobi majke i lošijih ishoda IVF-a (Cecchino i Garcia-Velasco 2019; Kim i Seli 2019; Luo i sur. 2023). Visoke razine mtDNA povezuju se s negativnim utjecajem na razvoj zametaka i smanjenim stopama trudnoće (Fragouli i sur., 2015; Diez-Juan i sur. 2015; Lledo i sur. 2018). S druge strane, smanjena proizvodnja ATP-a i niske razine mtDNA u oocitama i zamecima također mogu nepovoljno utjecati na razvoj zametaka i ishode trudnoće (Chappel 2013; Chuang i sur. 2023; Van Blerkom i sur. 1995).

Povijesno, gotovo sva istraživanja koja su promatrala količinu mtDNA u predimplantacijskim ljudskim zamecima analizirala su blastociste u različitim

stupnjevima ekspanzije blastocela te su uključivala pacijentice poodmakle reproduktivne dobi. Također, značajan broj istraživanja je prikupljao podatke iz različitih laboratorija, koristio različitu genetičku metodologiju ili nije koristio korekcijske faktore za precizno određivanje količine mtDNA.

Za razliku od dosadašnjih istraživanja, ovaj rad predstavlja rezultate detaljno razrađenog istraživanja u koje su uključene blastociste koje su imali stupanj ekspanzije blastocela 4, podrijetlom od pacijenata s jasno definiranim osnovnim značajkama. Posebna pažnja je posvećena uniformnosti pri biopsijama blastocista, odnosno sve blastociste je bioptirao jedan klinički embriolog. Ovaj pristup je odabran da se postigne što veća dosljednost u određivanju trenutka biopsije i ekspanzije blastocela, a samim time pokuša aproksimirati staničnost blastocista tijekom biopsija. Važnost navedenih parametara će se detaljnije obrazložiti tijekom rasprave. Također, svi bioptirani uzorci trofoektoderma su analizirani metodom NGS PGT-A, koja se danas smatra zlatnim standardom zbog svoje osjetljivosti, preciznosti i brzine (Alyafee i sur. 2021; Brezina i sur. 2013; Brezina i sur. 2016; Friedenthal i sur. 2016; Russo i sur. 2014), uz korištenje odgovarajućih faktora korekcije za spol i aneuploidije (Victor i sur. 2017).

### **5.1. Mitohondrijska DNA blastociste i dob majke**

U ovom istraživanju nisu utvrđene značajne korelacije između razina mtDNA blastocista i dobi majke. Za razliku od ovog rada koji je uključio žene mlađe reproduktivne dobi (< 35 godina), pojedina istraživanja koja su uključila žene mlađe i starije reproduktivne dobi ukazuju na korelaciju između mtDNA blastocista i dobi majke, s većim razinama mtDNA kod majki starije dobi (Fragouli i sur. 2015; Lledo i sur. 2018). Druga istraživanja, koja su također uključila žene mlađe i starije reproduktivne dobi, sukladno mojim rezultatima, nisu utvrdila značajnu svezu (Du i sur. 2021; Klimczak i sur. 2018; Luo i sur. 2023; Wang i sur. 2021).

Starenje je povezano sa smanjenjem funkcije mitohondrija, posebno u nereplicirajućim stanicama kao što su oocite te se starenje smatra glavnim uzrokom opadanja plodnosti u žena. Neplodnost usko vezana uz reproduktivnu dob češće se povezuje s oocitama lošijeg reproduktivnog potencijala nego s drugim čimbenicima kao što je endometrijska receptivnost. Smanjena mitohondrijska funkcija oocite najčešće je posljedica oksidativnog stresa, delecija i ostalih mutacija u mtDNA. Nakupljanje točkastih mutacija u

mtDNA oocita je karakteristično za poodmaklu reproduktivnu dob. Točkaste mutacije mogu zahvatiti regulatornu regiju mtDNA te tako utjecati na regulaciju transkripcije i replikacije mtDNA tijekom oogeneze, ili ukoliko dođe do uspješne oplodnje oocite i implantacije zametka, mogu utjecati na poslijeimplantacijski razvoj. Praćenjem točkaste mutacije T414G, koja se nalazi u regulatornoj regiji mtDNA, ustanovljeno je da mutacija zahvaća 4,4 % oocita u žena od 26 do 36 godina, dok u dobnoj skupini od 36 do 42 godine ista mutacija zahvaća čak 39,5 % oocita (Barritt i sur. 2000; Chappel 2013). Nadalje, povećanje incidencije česte mitohondrijske 4977 bp delecije povezano je sa starenjem u raznim tkivima i stanicama, a ista delecija je također zabilježena kod oocita (Fragouli i sur. 2015). Za razliku od jezgrinog genoma, mitohondrijski genom ima suboptimalnu mogućnost ispravka DNA (*engl.* proofreading). Ova karakteristika čini mtDNA ranjivom na akumulaciju mutacija odnosno delecija te se akumulacija štetnih mutacija u mtDNA oocita povezuje s dobno vezanim padom plodnosti. Istraživanja koja su pratila odnos mtDNA zametaka i dobi majke ukazuju da poodmakla reproduktivna dob može značajno utjecati na količine i kvalitetu mtDNA zametaka, što je posebno izraženo nakon 36. ili 37. godine života (Chappel i sur. 2013; Fragouli i sur. 2015; Woods i sur. 2018). Nepostojanje korelacije između razine mtDNA blastocista i dobi majke u ovom radu može se objasniti činjenicom da su u istraživanje uključene žene mlađe od 35 godina, čime su izbjegnuti mogući negativni učinci poodmakle reproduktivne dobi majke na mtDNA zametaka.

## **5.2. Mitohondrijska DNA blastociste i spolni kromosomi zametka**

Promatrajući sve zametke i skupine blastocista, nije utvrđena značajna korelacija u razinama mtDNA kod zametaka s kromosomima XX u odnosu na zametke s kromosomima XY. Rezultati mog istraživanja su u skladu s zapažanjima ostalih autora koji nisu ustanovili korelaciju između količine mtDNA blastocista i spola zametaka (Chuang i sur. 2023; Lledo i sur. 2018; Lukaszuk i Podolak 2022). Dobivene rezultate možemo pokušati objasniti dosadašnjim saznanjima o nasljeđivanju mitohondrijskog genoma kod ljudi. Mitohondrijski genom ranog zametka definiran je mitohondrijskim genomom nasljeđenim od oocite (Chappel 2013). Tijekom oplodnje, spermiji će odrediti spol zametka, ali neće imati utjecaj na mtDNA nakon oplodnje jer je nasljeđivanje mitohondrijskog genoma maternalno i zametak ne nasljeđuje mtDNA spermija (Chappel 2013). Spolni kromosomi ne bi trebali imati utjecaj ni na razine mtDNA tijekom predimplantacijskog razvoja zametka jer je u ovom vremenskom razdoblju replikacija

mtDNA odsutna. Drugim riječima, količina mtDNA ranih zametaka je vjerojatno određena prije nego spermij oplodi oocitu.

### **5.3. Mitohondrijska DNA blastociste i morfologija razvojnih stadija zametaka koji su prethodili stadiju blastociste (dan-2, dan-3 i dan-4)**

Kada sam usporedio razine mtDNA blastocista sa stupnjem fragmentacije dan-2 i dan-3 zametaka, nisam pronašao korelaciju. Ovaj nalaz nije iznenađujući jer je stupanj fragmentacije kod većine zametaka uključenih u ovo istraživanje bio blag, pri čemu je većina zametaka imala stupanj fragmentacije manji od 10 %. Samo su tri zametka imala umjereni stupanj fragmentacije, u rasponu od 10 % do 25 %, a niti jedan zametak nije imao stupanj fragmentacije veći od 25 %. Potencijalna korelacija između sadržaja mtDNA zametka i stupnja fragmentacije trebala bi se dodatno istražiti u budućim istraživanjima koja bi uključila zametke s višim stupnjem fragmentacije odnosno zametke sa umjerenom i teškom fragmentacijom. Mogući utjecaj stupnja fragmentacije na količinu mtDNA zametka će se dodatno raspraviti u hipotezi u potpoglavlju 5.5.

Analizirajući korelaciju mtDNA blastocista i morfološke ocjene staničnih stadija zametaka, otkrio sam da zameci loše kvalitete, ocjenjeni niže od 2-3 (2,5), imaju tendenciju razvoja u blastociste s nižim razinama mtDNA. Dodatno, morfološka ocjena dan-3 zametaka istaknula se kao prediktor za niskokvalitetne dan-6 blastociste, odnosno primijećeno je da pad ocjene dan-3 zametka za 1 povećava vjerojatnost razvoja zametka u niskokvalitetnu dan-6 blastocistu za 3,52 puta. Nadalje, promatrajući dan-4 zametke, zabilježio sam da blastociste koje nisu započele proces kompakcije u četvrtom danu imaju značajno niže razine mtDNA od ostalih blastocista. Pregledom dostupne literature nisam pronašao istraživanja koja opisuju ovisnost razina mtDNA blastocista i morfoloških karakteristika dan-2, dan-3 i dan-4 zametaka te korelacije identificirane u ovom istraživanju predstavljaju nov nalaz. Navedena zapažanja o odnosu mtDNA i morfologije razvojnih stadija zametaka koji su prethodili stadiju blastociste sugeriraju povezanost razine mtDNA i neoptimalnog morfološkog razvoja zametaka. Istraživanja koja su pratila odnos količine mtDNA u uzgojnom mediju i morfologije zametaka ustanovila su više razine "slobodne" mtDNA u mediju niskokvalitetnih zametaka, što sugerira veću podložnost niskokvalitetnih zametaka staničnih stadija gubitku mtDNA (Alikani i sur. 2000; Razik i sur. 2016; Zhang i sur. 2021).

#### **5.4. Mitohondrijska DNA blastociste i dan razvoja potpuno ekspandirane blastociste**

Istražujući ovisnost razina mtDNA i dan razvoja potpuno ekspandirane blastociste, dobio sam značajno više razine mtDNA kod euploidnih dan-5 blastocista u odnosu na euploidne dan-6 blastociste. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima drugih istraživanja koja su pratila razine mtDNA kod dan-5 i dan-6 blastocista i utvrdila više razine mtDNA kod dan-5 blastocista (Chuang i sur. 2023; Klimczak i sur. 2018; Lledo i sur. 2018; Lukaszuk i Podolak 2022; Luo i sur. 2023; Wang i sur. 2021; Wu i sur. 2021). Važno je napomenuti da je ovo prvo istraživanje koje je utvrdilo ovaj nalaz kod euploidnih blastocista bioptiranih pri stupnju ekspanzije blastocela 4. Nedavno istraživanje koje je provedeno kod blastocista bioptiranih pri stupnju ekspanzije blastocela 5, potvrđuje moje rezultate (Chuang i sur. 2023).

Veće razine mtDNA dan-5 blastocista u odnosu na mtDNA dan-6 blastociste znanstvenici objašnjavaju s dvije hipoteze. Prva hipoteza pronalazi objašnjenje u “razvodnjavanju” mtDNA, odnosno govori da je razina mtDNA ovisna o broju staničnih dioba koje su prethodile biopsiji zametka (Lledo i sur. 2018). Druga hipoteza se oslanja na saznanja o nasljeđivanju mtDNA te govori da dan-6 blastociste nastaju od oocita sa suboptimalnim razinama mtDNA koje uvjetuju sporiji razvoj zametaka te takvi zamci trebaju dodatno vrijeme za dovršetak blastulacije (Wu i sur. 2021).

#### **5.5. Mitohondrijska DNA blastociste i morfologija euploidne blastociste**

Uspoređujući razine mtDNA između svih euploidnih visokokvalitetnih i niskokvalitetnih blastocista, neovisno o danu formiranja blastocista, uočio sam značajno više razine mtDNA kod visokokvalitetnih blastocista. Rezultati dosadašnjih istraživanja na ovu temu su oprečni. Pojedina istraživanja nisu ustanovila korelaciju između razina mtDNA i morfoloških karakteristika blastocista (Lledo i sur. 2018; Lukaszuk i Podolak 2022; Luo i sur. 2023; Wu i sur. 2021), ili su ustanovila korelaciju ali ne kod euploidnih blastocista (Klimczak i sur. 2018), dok je dio istraživanja, suprotno rezultatima mog rada, povezao niže razine mtDNA s trofoektodermom više kvalitete (Wang i sur. 2021).

Usporedba između istraživanih skupina u ovom radu otkrila je značajno niže razine mtDNA kod niskokvalitetnih dan-6 blastocista u odnosu na ostale skupine. Ovo je prvo

istraživanje koje je detektiralo niže razine mtDNA kod euploidnih niskokvalitetnih dan-6 blastocista te rezultati imaju veći značaj s obzirom da su sve blastociste bioptirane pri istom stupnju ekspanzije blastocela. Nedavno istraživanje koje je proučavalo ishod IVF postupka nakon prijenosa euploidnih dan-6 blastocista pokazalo je niže razine mtDNA kod blastocista čiji su prijenosi u materijale imali negativne ishode (Chuang i sur. 2023). Navedeni rezultati se mogu povezati s rezultatima ovog rada koji ukazuju da su niže razine mtDNA povezane s nižom kvalitetom dan-6 blastocista odnosno s blastocistama lošije morfologije i smanjenog reproduktivnog potencijala. Također, u ovom istraživanju razina mtDNA se pokazala kao jedan od prediktora za kvalitetu blastociste. Udvostručenjem razina mtDNA blastociste smanjili su se izgledi za niskokvalitetnu blastocistu 3,43 puta, a navedeni model je imao preciznost od 61,9 % pri predviđanju niskokvalitetnih blastocista. Navedeni rezultati učvršćuju vezu između nižih razina mtDNA i niže morfološke kvalitete blastocista.

## **5.6. Moguće objašnjenje korelacije razine mtDNA i morfološke ocjene te kinetike razvoja zametaka**

Korelacija između razina mtDNA i morfološke ocjene te kinetike razvoja zametka dobivena u ovom istraživanju mogla bi se objasniti postojećim hipotezama, ili njihovim kombiniranim djelovanjem, odnosno brojem staničnih dioba koje su prethodile biopsiji (Lledo i sur. 2018) i podrijetlom blastocista sporije kinetike razvoja od oocita sa suboptimalnim razinama mtDNA (Wu i sur. 2021). Dodatna hipoteza, temeljena na rezultatima ovog rada i detaljnoj analizi razvoja zametaka uključenih u istraživanje nudi objašnjenje povezano s neoptimalnim predimplantacijskim razvojem zametaka.

Optimalna morfologija staničnih stadija zametka definirana je odgovarajućim brojem blastomera podjednakog volumena (Alpha Scientists in Reproductive and Embryology 2011). Drugim riječima, ključni parametri za ocjenjivanje zametaka u staničnim stadijima su broj blastomera i simetrija staničnih dioba. Vjeruje se da tijekom najranijih staničnih dioba ukupna količina mtDNA zametka ostaje stabilna jer se mitohondriji i mtDNA iz oocite pravilo raspodjeljuju među blastomerama (Cecchino i Garcia-Velasco 2019; De Munck i sur. 2019; Hashimoto i sur. 2017), odnosno svakom staničnom diobom mtDNA se "razvodnjava" među sestrinskim blastomerama dok ukupna količina mtDNA zametka nasljeđena od oocite ostaje postojana zbog odsustva replikacije mtDNA. Primarni razlozi

niskih morfoloških ocjena niskokvalitetnih zametaka koji su uključeni u ovo istraživanje su bili asimetrija blastomera i odstupanje od idealnog broja blastomera. Asimetrične diobe u predimplantacijskim zamecima često su popraćene fragmentacijom, zastojem u razvoju i staničnom smrću embrionalnih stanica. Asimetrične stanične diobe rezultiraju blastomerama nejednakog volumena, što bi moglo utjecati na asimetričnu raspodjelu mitohondrija i mtDNA unutar zametka. To može dovesti do smanjenog ili povećanog mitohondrijskog bazena (*engl.* mitochondrial pool) sestrinskih blastomera, što posljedično utječe na buduće generacije stanica. Ovaj učinak bi mogao biti izraženiji ako se asimetrične stanične diobe događaju tijekom najranijih dioba zametka, osobito ako se obrazac asimetričnih dioba nastavi u kasnijim generacijama stanica. Dodatno, fragmentacija, zastoj u razvoju, i stanična smrt jedne ili više embrionalnih stanica, odnosno blastomera, mogu rezultirati gubitkom mtDNA ranog zametka. Posljedično, ako se blastocista formira nakon navedenih događaja i gubitaka možemo očekivati da preostala mtDNA neće odražavati početnu količinu mtDNA zametka. Moguće je da asimetrične stanične diobe, koje rezultiraju asimetričnom raspodjelom mitohondrija te gubitak mtDNA usljed fragmentacije zametka, zastoja u razvoju blastomera i stanične smrti, pojedinačno ili u sinergiji, mogu uzrokovati alteracije razina mtDNA u zamecima, mozaicizme u raspodjeli mitohondrija i mtDNA te varijabilnost kvantitativnih i kvalitativnih osobina mtDNA među embrionalnim stanicama.

U prilog ovoj hipotezi idu istraživanja koja su ukazala da fragmenti blastomera, uključujući apoptična tijela i anuklearne citoplazmatske dijelove, otpuštaju mtDNA u sekretom zametka. Dokazana je značajna korelacija između količine mtDNA u uzgojnom mediju i morfološke ocjene te stupnja fragmentacije staničnih zametaka, pri čemu su više razine mtDNA zabilježene u mediju niskokvalitetnih zametaka u usporedbi s visokokvalitetnim zamecima, što sugerira veću podložnost niskokvalitetnih zametaka gubitku mtDNA (Alikani i sur. 2000; Razik i sur. 2016; Zhang i sur. 2021). Nadalje, studija koje je pratila dinamiku raspodjele mtDNA unutar osmostaničnih zametaka, otkrila je značajne varijacije mtDNA među blastomerama istog zametka (Lin i sur. 2004). Istraživanja temeljena na transmisijskoj elektronskoj mikroskopiji (*engl.* transmission electron microscopy; TEM), dokazala su manju količinu mitohondrija u fragmentiranim, niže kvalitetnim blastomerama u usporedbi s morfološki urednim blastomerama (Chi i sur. 2011) te je TEM metodom detektirano da su mitohondriji najzastupljeniji organeli u citoplazmatskim fragmentima (Halvaei i sur., 2016).

Nadalje, ljudsku vrstu karakterizira široka raznolikost mtDNA, osim varijacija između pojedinaca, postoje varijacije unutar istog organizma, pa čak i unutar tkiva i između pojedinih stanica. Istraživanja ukazuju da heteroplazmija mtDNA utječe na količine mtDNA unutar stanica te možda postoji veza između heteroplazmije mtDNA i nepovoljnih ishoda IVF zahvata (Mertens i sur. 2022; Lledo i sur. 2018; Van Der Kelen 2024; Zhang i Wu 2023). Heteroplazmija mtDNA oocite može opstati i nakon oplodnje te se može zadržati tijekom embrionalnog razvoja odnosno može pratiti pojedinca kroz čitav životni vijek. Patogene varijante mtDNA su često prisutne kod zdravih ljudi te je udio patogenih varijanti približno 2 % u odnosu na ukupnu količinu mtDNA. Sekvenciranje je otkrilo da mtDNA približno 50 % oocita varira u usporedbi sa mtDNA sestrinskih oocita te da oocite sadrže varijante mtDNA jedinstvene samo za njih. Jedinstvene varijante često uzrokuju promjene u rRNA i tRNA genima i njihov patogeni učinak je vjerojatno ograničen činjenicom da je njihov udio u mtDNA gotovo uvijek ispod 5 %. Međutim, zabilježen je pad patogenih varijanti mtDNA između trećeg i petog dana razvoja zametka, što upućuje na postojanje selektivnih mehanizama koji filtriraju patogene varijante mtDNA (Mertens i sur. 2022, Lledo i sur. 2018). Zabilježeni pad, odnosno potencijalna filtracija patogenih varijanti bi mogla utjecati na ukupnu količinu mtDNA zametka i smanjiti količinu mtDNA u zamecima sa povišenim postotkom patogenih varijanti. Ovaj utjecaj bi mogao biti izraženiji kod zametaka podrijetlom od oocita koje imaju veći postotak negativnih mutacija mtDNA. Iako, izgledno je da filtracija patogenih varijanti ima relativno blag utjecaj na količinu mtDNA zametka zbog niskog udjela patogenih varijanti u odnosu na ukupnu količinu mtDNA.

## **5.7. Mitohondrijska DNA blastociste i ploidija blastociste**

Uspoređujući razine mtDNA svih euploidnih i aneuploidnih blastocista nisam uočio statistički značajnu razliku. Ovaj rezultat ne potvrđuje jednu od početnih hipoteza istraživanja, odnosno ovisnost količine mtDNA i ploidije zametka. Do sada provedena istraživanja koja su uspoređivala razine mtDNA euploidnih i aneuploidnih blastocista često imaju oprečne rezultate, neki autori su pronašli statistički značajne razlike (de Los Santos i sur. 2018; Fragouli i sur. 2015; Klimczak i sur. 2018; Luo i sur. 2023; Wang i sur. 2022), dok ostali nisu (Du i sur. 2021; Victor i sur. 2017). Victor i sur. (2017) proučavali su ovisnost mtDNA o ploidiji zametaka paralelno koristeći dvije platforme, NGS PGT-A i qPCR te njihovi rezultati nisu pokazali ovisnost mtDNA o ploidiji blastocista.

Diskrepancije dosadašnjih istraživanja objašnjavaju tvrdnjom da veliki broj studija koristi podatke iz više klinika, aglomerirajući sve rezultate te ostaje nejasno odgovaraju li aglomerirani rezultati rezultatima pojedinačnih istraživanja. Napominju i da precizno određivanje razine mtDNA zahtjeva korištenje faktora korekcije, odnosno da se pri izračunu razine mtDNA mora uzeti u obzir sastav genoma koji se analizira, dok brojna istraživanja nisu uzela u obzir faktore korekcije. Ukoliko se ne koriste odgovarajući faktori korekcije za spol i aneuploidije, rezultati PGT-A neće biti precizni te mogu dovesti do pogrešnih zaključaka.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da IVF zameci imaju visoke ukupne stope aneuploidije, više od 50 % (Morris i sur. 2021; Schaeffer i sur. 2018). Dob majke već se dugo smatra najznačajnijim čimbenikom u etiologiji aneuploidije te je poznato da određeni postotak aneuploidija zametaka nastaje zbog grešaka tijekom sazrijevanja gameta, odnosno prije oplodnje. Aneuploidija zahvaća približno 10-25 % oocita žena u ranim tridesetim godinama, dok se postotak aneuploidije povećava na više od 50 % u oocitama žena starijih od 40 godina (Martin 2008; Thomas i sur. 2021). Većina istraživanja na ovu temu provedena je kod pacijentica koje su prolazile kroz IVF postupke i koje su dobivale terapiju hormonima u svrhu stimulacije jajnika te su zbog toga ovi postotci vjerojatno veći nego u prirodnim ciklusima. Kod oocita, 90-95 % poremećaja odnosi se na numeričke poremećaje kromosoma, dok se 5-10 % odnosi na strukturne poremećaje. Za razliku od oocita većina kromosomskih poremećaja spermija je strukturne prirode. Najveća pojavnost poremećaja u oocitama odnosi se na kromosome 21 i 22, koji su ujedno i najmanji ljudski kromosomi te kromosom 16, dok je u spermijima najveća incidencija poremećaja kromosoma 21, 22 i spolnih kromosoma (Battaglia i sur. 1996; Martin 2008; Pellestor i sur. 2002). Zanimljivo, u našem istraživanju 13 aneuploidnih blastocista (približno 38 %) bilo je zahvaćeno poremećajima koje su se odnosile na kromosome 21, 22, 16 ili spolne kromosome.

Malo je vjerojatno da aneuploidije nastale nakon oplodnje doprinose ukupnoj razini mtDNA zametka, jer je tijekom ranog razvoja zametaka sisavaca ekspresija faktora replikacije mtDNA jako niska ili odsutna (May-Panloup i sur. 2005; Spikings i sur. 2007; Thundathil i sur. 2005). Iako, ne možemo u potpunosti isključiti postojanje nekih do danas nepoznatih mehanizama, kojima bi aneuploidni zameci nadoknadili određene nedostatke preuranjenom replikacijom mtDNA. S druge strane, aneuploidije nastale prije oplodnje

mogle bi imati utjecaj na mtDNA zametka. Istraživanje koje je uspoređivalo razine mtDNA između euploidnih i aneuploidnih oocita detektiralo je veće razine mtDNA kod aneuploidnih oocita kojima su otkrivene greške u mejozi. Autori objašnjavaju da se tijekom mejoze I mitohondriji nakupljaju i pravilno raspoređuju u blizini mejotskog vretena. Ukoliko mitohondriji imaju smanjenu funkcionalnost, kao posljedicu poodmakle reproduktivne dobi majke, oksidativnog stresa, ili nekog drugog čimbenika, broj mitohondrija se povećava te mitohondriji na taj način pokušavaju nadoknaditi svoje funkcionalne nedostatke. Ovi čimbenici mogu utjecati na greške pri segregaciji kromosoma tijekom mejoze (Parks i sur. 2021). Dosadašnja istraživanja ukazuju da je poodmakla reproduktivna dob majke vodeći uzrok funkcionalnih nedostataka oocita te je njen utjecaj na incidenciju aneuploidije oocita najizraženiji nakon 35. godine života (Mikwar i sur. 2020; Wang i sur. 2023). S povećanjem reproduktivne dobi, oocite postaju sklonije mejotskim greškama koje rezultiraju aneuploidijom oocita (Huang i sur. 2024).

Uočeni izostanak korelacije razina mtDNA u odnosu na ploidiu zametka u mom istraživanju mogao bi se objasniti sljedećim. Poodmakla reproduktivna dob vodeći je uzrok aneuploidija u oocitama (Mikwar i sur. 2020; Wang i sur. 2023), dok su oocite žena mlađe reproduktivne dobi manje podložne mejotskim greškama odnosno imaju manje stope aneuploidije (Huang i sur. 2024; Thomas i sur. 2021). S obzirom da je početna količina mtDNA zametka definirana onom naslijeđenom iz oocite (Chappel 2013) i da se visok udio aneuploidija zametaka događa tijekom prve tri mitotske diobe zametka (Lee i Kiessling 2017; Mantikou i sur. 2012), moguće je da kod žena mlađe reproduktivne dobi aneuploidije zametaka često imaju podrijetlo od mitotskih grešaka tijekom najranijeg embrionalnog razvoja, odnosno da nastaju nakon oplodnje. Po dosadašnjim saznanjima, mala je vjerojatnost da aneuploidije nastale nakon oplodnje mogu utjecati na količinu mtDNA ranog zametka zbog odsutnosti replikacije mtDNA (Chappel 2013; Mertens i sur. 2022; St John i sur. 2010; St John 2014, Thundathil i sur. 2005).

## **5.8. Mitohondrijska DNA kao novi biomarker pri selekciji zametka nastalih u postupcima izvantjelesne oplodnje**

Uzevši u obzir nasljeđivanje mtDNA i njeno “razvodnjavanje” tijekom ranog embrionalnog razvoja te činjenicu da broj stanica koje čine blastocistu može značajno varirati (Hardarson i sur. 2003; Iwasawa i sur. 2019), indikativno je da broj stanica unutar

zametka u trenutku biopsije ima ulogu pri interpretaciji razine mtDNA. Drugim riječima, pri svakoj staničnoj diobi zametka, nDNA se replicira te se ukupna količina nDNA udvostručuje, dok ukupna količina mtDNA ostaje postojana zbog odsutnosti njene replikacije. Budući da se tijekom najranijih staničnih dioba mtDNA raspodjeljuje među sestrinskim stanicama, svakom generacijom staničnih dioba dolazi do promjene omjerna mtDNA i nDNA (2:1 u korist nDNA). Iz toga proizlazi da biopsija iste blastociste daje različit omjer mtDNA/nDNA (razinu mtDNA) ovisno o staničnosti blastociste, odnosno o broju staničnih dioba kroz koje su prošle stanice zametka. Stoga je moguće da se količina mtDNA može krivo interpretirati ukoliko nam nije poznata staničnost zametka te se količina mtDNA trenutno ne može pouzdano koristiti kao dodatni biomarker pri selekciji IVF zametaka. Ipak, vjerujem da mtDNA u budućnosti ima veliki potencijal kao dodatni biomarker pri selekciji IVF zametaka. Iako, potrebna je revizija metodologije prije nego se metoda implementira u dijagnostičke svrhe. Revizija metodologije trebala bi uključiti razvoj nove tehnologije koja bi odredila staničnost blastociste neposredno prije biopsije zametka, standardizaciju protokola i metodologije koja se koristi pri određivanju količine mtDNA te obvezno korištenje faktora korekcije za spol i moguće aneuploidije zametaka.

Istraživanja (Chappel 2013; Diez-Juan i sur. 2015; Fragouli i sur. 2015; May-Panloup i sur. 2005; Lledo i sur. 2018; Reynier i sur. 2001) ukazuju da količina mtDNA u oocitama i zamecima korelira s uspjehom oplodnje, dinamikom razvoja i morfološkim karakteristikama zametaka. Također, navedena istraživanja ukazuju da oboje, niske i visoke razine mtDNA mogu nepovoljno utjecati na razvoj zametaka ili stope trudnoće. Navedeni rezultati, kao i rezultati ovog istraživanja su u suprotnosti sa vjerovanjem nekih autora da niske razine mtDNA povoljno utječu na reproduktivni potencijal zametaka te da su jedino visoke razine mtDNA indikacija lošijeg reproduktivnog potencijala (Diez-Juan i sur. 2015; Fragouli i sur. 2015). Temeljem dobivenih rezultata, potrebno je uspostaviti referentne vrijednosti količine mtDNA, odnosno zonu optimalne količine mtDNA koja bi bila specifična za svaku razvojnu fazu IVF zametaka. Vjerujem da bi razvojem specifičnih referentnih vrijednosti količine mtDNA, s definiranim donjim i gornjim granicama, izračunatim za svaki razvojni stadij zametka, mogli dobiti vrijedan novi biomarker pri selekciji IVF zametaka. Pouzdana metodologija za određivanje omjera mtDNA i nDNA već postoji, kao i faktori korekcije. Najveća prepreka ostvarenju ovog cilja je izračunavanje staničnosti blastociste.

Ljudskim okom uz pomoć mikroskopa, teško je, nepouzđano i vremenski zahtjevno izraćunati stanićnost blastociste. U svrhu izraćunavanja stanićnosti blastociste trebao bi se razviti specijalizirani raćunalni program koji bi uz pomoć umjetne inteligencije (*engl.* artificial intelligence; AI) i mikroskopske optike neposredno prije biopsije detektirao broj stanica unutar zametka. Iako ovakav specijalizirani program trenutno ne postoji, s obzirom na današnju tehnologiju, odnosno napredak AI-a, kvalitetu mikroskopske optike i standardno korišćenje kamera visoke rezolucije u time-lapse inkubatorima (Desai i sur. 2014; Giménez i sur. 2023) i ostaloj IVF mikroskopiji (Palter i sur. 2016), moguće je inkorporirati sličan raćunalni program u sustave koji se upotrebljavaju pri vizualizaciji zametaka u IVF laboratoriju. Slični raćunalni programi koji određuju karakteristike i brojnost stanica već postoje te se koriste u IVF laboratorijima (Jiang i sur. 2023), sustavima za automatiziranu analizu ejakulata (Cherouveim i sur. 2023; Goss i sur. 2024; Tsai i sur. 2020) i brojnim drugim granama biologije (Ali i sur. 2025; Liu i sur. 2025).

## 6. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju analizirani su bioinformatički podaci prikupljeni embriološkim praćenjem morfokinetskog razvoja 159 blastocista nastalih u postupcima MPO i dijagnostičkom postupkom predimplantacijskog genetičkog testiranja za aneuploidiju. Ovo je prvo istraživanje koje je isključivo analiziralo mtDNA blastocista sa stupnjem ekspanzije blastocela 4. Jasno definirani kriteriji uključenja uz ograničenje dobi majke (< 35 godina) te konzistentnost biopsija daju veću specifičnost rezultatima.

S obzirom na dobivene rezultate zaključci su sljedeći:

1. Kod žena koje nisu u poodmakloj reproduktivnoj dobi (< 35 godina), dob majke nema značajan utjecaj na količinu mtDNA blastociste, ploidiju blastociste, kvalitetu te dan nastanka blastociste. Nadalje, spolni kromosomi nemaju značajan utjecaj na razinu mtDNA blastociste, ploidiju blastociste, kvalitetu i dan nastanka blastociste.
2. Niskokvalitetni zameci, ocjenjeni niže od 2-3 (2,5), imaju tendenciju razvoja u blastociste s nižom količinom mtDNA. Morfološka ocjena dan-3 zametaka istaknula se kao prediktor za niskokvalitetne dan-6 blastociste. Nadalje, blastociste koje nisu započele proces kompakcije u četvrtom danu pokazale su značajno niže razine mtDNA od blastocista koje su započele kompakciju i onih čiji je cijeli volumen u kompakciji.
3. Dan-5 blastociste imaju značajno više razine mtDNA od dan-6 blastocista, neovisno o morfološkoj kvaliteti blastociste; visokokvalitetne blastociste imaju značajno više razine mtDNA od niskokvalitetnih blastocista, neovisno o danu nastanka blastociste; niskokvalitetne dan-6 blastociste imaju značajno niže razine mtDNA u odnosu na visokokvalitetne dan-5 blastociste, niskokvalitetne dan-5 blastociste i visokokvalitetne dan-6 blastociste.
4. Korelacija između količine mtDNA i morfološke ocjene te kinetike razvoja zametaka dobivena u ovom istraživanju mogla bi se objasniti brojem staničnih dioba koje su prethodile biopsiji i podrijetlom spororastućih zametaka od oocita sa suboptimalnim razinama mtDNA. Dodatno, asimetrične stanične diobe tijekom predimplantacijskog razvoja mogle bi rezultirati asimetričnom raspodjelom mitohondrija unutar zametka te je moguć gubitak mtDNA kao posljedica fragmentacije, zastoja u razvoju i smrti

embrionalnih stanica. Posljedično, ako se blastocista razvije nakon navedenih događaja i gubitaka, može se očekivati da preostala mtDNA neće odražavati početnu količinu mtDNA zametka.

5. Nije utvrđena značajna razlika između razina mtDNA euploidnih i aneuploidnih blastocista. Moguće objašnjenje ovog rezultata leži u zakonitostima maternalnog nasljeđivanja mtDNA, podrijetlu aneuploidije zametka i činjenice da oocite žena mlađe reproduktivne imaju niže stope aneuploidije i negativnih mutacija mtDNA. Izgledno je da visoki udio aneuploidija u zamecima žena mlađe reproduktivne dobi nastaje zbog mitotskih grešaka tijekom najranijeg embrionalnog razvoja, odnosno da su nastale nakon oplodnje. Zbog odsutnosti replikacije mtDNA, koja započinje tek kada embrionalne stanice iniciraju diferencijaciju, malo je vjerojatno da će aneuploidije nastale nakon oplodnje značajno utjecati na količinu mtDNA zametka tijekom ranog embrionalnog razvoja.

6. Količina mtDNA trenutno nije pouzdan dodatni biomarker pri selekciji zametka nastalih u postupcima IVF-a, iako, potencijal za njenu kliničku primjenu postoji. Detekcijom staničnosti blastociste i razvojem specifičnih referentnih vrijednosti razina mtDNA, sa definiranim donjim i gornjim granicama, mogli bi dobiti vrijedan novi biomarker pri selekciji IVF zametaka.

## 7. POPIS LITERATURE

Acton, B. M., Jurisicova, A., Jurisica, I., & Casper, R. F. (2004). Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Molecular human reproduction*, 10(1), 23–32.

Ajduk, A., & Zernicka-Goetz, M. (2012). Advances in embryo selection methods. *F1000 biology reports*, 4, 11.

Ahmad, M. F., Elias, M. H., Mat Jin, N., Abu, M. A., Syafruddin, S. E., Zainuddin, A. A., Suzuki, N., & Abdul Karim, A. K. (2024). Oocytes Quality Assessment-The Current Insight: A Systematic Review. *Biology*, 13(12), 978.

Antonouli, S., Di Nisio, V., Messini, C., Daponte, A., Rajender, S., & Anifandis, G. (2023). A comprehensive review and update on human fertility cryopreservation methods and tools. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1151254.

Ali, M., Benfante, V., Basirinia, G., Alongi, P., Sperandeo, A., Quattrocchi, A., Giannone, A. G., Cabibi, D., Yezzi, A., Di Raimondo, D., Tuttolomondo, A., & Comelli, A. (2025). Applications of Artificial Intelligence, Deep Learning, and Machine Learning to Support the Analysis of Microscopic Images of Cells and Tissues. *Journal of imaging*, 11(2), 59.

Alikani, M., Calderon, G., Tomkin, G., Garrisi, J., Kokot, M., & Cohen, J. (2000). Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(12), 2634–2643.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(6), 1270–1283.

Alyafee, Y., Alam, Q., Tuwaijri, A. A., Umair, M., Haddad, S., Alharbi, M., Alrabiah, H., Al-Ghuraibi, M., Al-Showaier, S., & Alfadhel, M. (2021). Next-Generation Sequencing-Based Pre-Implantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A): First Report from Saudi Arabia. *Genes*, 12(4), 461.

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465.

Antico Arciuch, V. G., Elguero, M. E., Poderoso, J. J., & Carreras, M. C. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxidants & redox signaling*, 16(10), 1150–1180.

Aoyama, N., & Kato, K. (2020). Trophectoderm biopsy for preimplantation genetic test and technical tips: A review. *Reproductive medicine and biology*, 19(3), 222–231.

Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrou, T., Pellestor, F., Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., & Hamamah, S. (2006). The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(7), 1705–1719.

Babayev, E., & Seli, E. (2015). Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 27(3), 175–181.

Barritt, J. A., Cohen, J., & Brenner, C. A. (2000). Mitochondrial DNA point mutation in human oocytes is associated with maternal age. *Reproductive biomedicine online*, 1(3), 96–100.

Battaglia, D. E., Goodwin, P., Klein, N. A., & Soules, M. R. (1996). Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Human reproduction (Oxford, England)*, 11(10), 2217–2222.

Bi, C., Wang, L., Fan, Y., Yuan, B., Alsolami, S., Zhang, Y., Zhang, P. Y., Huang, Y., Yu, Y., Izipisua Belmonte, J. C., & Li, M. (2023). Quantitative haplotype-resolved analysis of mitochondrial DNA heteroplasmy in Human single oocytes, blastoids, and pluripotent stem cells. *Nucleic acids research*, 51(8), 3793–3805.

Breda, C. N. S., Davanzo, G. G., Basso, P. J., Saraiva Câmara, N. O., & Moraes-Vieira, P. M. M. (2019). Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox biology*, 26, 101255.

Brezina, P. R., Anchan, R., & Kearns, W. G. (2016). Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(7), 823–832.

Brezina, P. R., Ke, R. W., & Kutteh, W. H. (2013). Preimplantation genetic screening: a practical guide. *Clinical medicine insights. Reproductive health*, 7, 37–42.

Cecchino, G. N., & Garcia-Velasco, J. A. (2019). Mitochondrial DNA copy number as a predictor of embryo viability. *Fertility and sterility*, 111(2), 205–211.

Chan, C. C., Liu, V. W., Lau, E. Y., Yeung, W. S., Ng, E. H., & Ho, P. C. (2005). Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Molecular human reproduction*, 11(12), 843–846.

Chappel S. (2013). The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstetrics and gynecology international*, 2013, 183024.

Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y. E., Chomyn, A., Prolla, T. A., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*, 141(2), 280–289.

Cherouveim, P., Velmahos, C., & Bormann, C. L. (2023). Artificial intelligence for sperm selection-a systematic review. *Fertility and sterility*, 120(1), 24–31.

Chi, H. J., Koo, J. J., Choi, S. Y., Jeong, H. J., & Roh, S. I. (2011). Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. *Fertility and sterility*, 96(1), 187–192.

Chial, H., & Craig, J. (2008). mtDNA and mitochondrial diseases. *Nature Education*, 1(1), 217.

Chowdhury, S. H., Cozma, A. I., & Chowdhury, J. H. (2017). Infertility. In *Essentials for the Canadian Medical Licensing Exam: Review and prep for MCCQE Part I* (2nd ed.). Wolters Kluwer.

Chuang, T. H., Chen, C. Y., Kuan, C. S., Lai, H. H., Hsieh, C. L., Lee, M. J., Liang, Y. T., Chang, Y. J., Chen, C. Y., & Chen, S. U. (2023). Reduced mitochondrial DNA content correlate with

poor clinical outcomes in cryotransfers with day 6 single euploid embryos. *Frontiers in endocrinology*, 13, 1066530.

Cimadomo, D., Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Scarica, C., Palagiano, A., Canipari, R., & Rienzi, L. (2016). The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *BioMed research international*, 2016, 7193075.

Cimadomo, D., Rienzi, L., Capalbo, A., Rubio, C., Innocenti, F., García-Pascual, C. M., Ubaldi, F. M., & Handyside, A. (2020). The dawn of the future: 30 years from the first biopsy of a human embryo. The detailed history of an ongoing revolution. *Human reproduction update*, 26(4), 453–473.

Cole L. W. (2016). The Evolution of Per-cell Organelle Number. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 85.

Cotterill, M., Harris, S. E., Collado Fernandez, E., Lu, J., Huntriss, J. D., Campbell, B. K., & Picton, H. M. (2013). The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis in vivo and during oocyte maturation in vitro. *Molecular human reproduction*, 19(7), 444–450.

CORDIS (2016). Novel players of mitochondrial gene regulation. European Commission.

da Fonseca Junior, A. M., Ispada, J., Dos Santos, E. C., de Lima, C. B., da Silva, J. V. A., Paulson, E., Goszczynski, D. E., Goissis, M. D., Ross, P. J., & Milazzotto, M. P. (2023). Adaptive response to changes in pyruvate metabolism on the epigenetic landscapes and transcriptomics of bovine embryos. *Scientific reports*, 13(1), 11504.

de Los Santos MJ, Diez Juan A, Mifsud A, Mercader A, Meseguer M, Rubio C, et al. Variables associated with mitochondrial copy number in human blastocysts: what can we learn from trophectoderm biopsies? *Fertil Steril*. 2018;109:110-117.

De Munck, N., Liñán, A., Elkhatab, I., Bayram, A., Arnanz, A., Rubio, C., Garrido, N., Lawrenz, B., & Fatemi, H. M. (2019). mtDNA dynamics between cleavage-stage embryos and blastocysts. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(9), 1867–1875.

Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L. R., Austin, C., Goldberg, J., & Falcone, T. (2014). Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using

continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 12, 54.

Dickson, D., Tao, T., & Qin, W. (2024). Exploring mitochondrial DNA content as a novel biomarker to improve embryo implantation potential: A review. *Biomedical Technology*, 5, 82–86.

Diez-Juan, A., Rubio, C., Marin, C., Martinez, S., Al-Asmar, N., Riboldi, M., Díaz-Gimeno, P., Valbuena, D., & Simón, C. (2015). Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertility and sterility*, 104(3), 534–41.e1.

Du, S., Huang, Z., Lin, Y., Sun, Y., Chen, Q., Pan, M., & Zheng, B. (2021). Mitochondrial DNA Copy Number in Human Blastocyst: A Novel Biomarker for the Prediction of Implantation Potential. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 23(5), 637–642.

Dumollard, R., Marangos, P., Fitzharris, G., Swann, K., Duchen, M., & Carroll, J. (2004). Sperm-triggered  $[Ca^{2+}]$  oscillations and  $Ca^{2+}$  homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development (Cambridge, England)*, 131(13), 3057–3067.

El Shourbagy, S. H., Spikings, E. C., Freitas, M., & St John, J. C. (2006). Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction (Cambridge, England)*, 131(2), 233–245.

Embryotools (2025). 05 – Embryo biopsy: How to implement a successful PGT program.

Eldar-Geva, T., Srebnik, N., Altarescu, G., Varshaver, I., Brooks, B., Levy-Lahad, E., Bromiker, R., & Schimmel, M. S. (2014). Neonatal outcome after preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and sterility*, 102(4), 1016–1021.

Esfandiari, N., Bunnell, M. E., & Casper, R. F. (2016). Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(11), 1439–1444.

European Society of Human Reproduction and Embryology. (2014, July). ART fact sheet. Archived March 4, 2016.

Falkenberg M. (2018). Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays in biochemistry*, 62(3), 287–296.

Farsi, M. M., Kamali, N., & Pourghasem, M. (2013). Embryological aspects of oocyte in vitro maturation. *International journal of molecular and cellular medicine*, 2(3), 99–109.

Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C. E., Minasi, M. G., & Greco, E. (2014). Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(12), 2802–2813.

Fragouli, E., Spath, K., Alfarawati, S., Kaper, F., Craig, A., Michel, C. E., Kokocinski, F., Cohen, J., Munne, S., & Wells, D. (2015). Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS genetics*, 11(6), e1005241.

Friedenthal, J., Maxwell, S. M., Munné, S., Kramer, Y., McCulloh, D. H., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2018). Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertility and sterility*, 109(4), 627–632.

Fvasconcellos. (2007). Mitochondrial electron transport chain—Etc4.svg [Vector image]. Wikimedia Commons.

Gabaldón, T., & Huynen, M. A. (2004). Shaping the mitochondrial proteome. *Biochimica et biophysica acta*, 1659(2-3), 212–220.

García-Pascual, C. M., Navarro-Sánchez, L., Navarro, R., Martínez, L., Jiménez, J., Rodrigo, L., Simón, C., & Rubio, C. (2020). Optimized NGS Approach for Detection of Aneuploidies and Mosaicism in PGT-A and Imbalances in PGT-SR. *Genes*, 11(7), 724.

Gardner, D. K., & Schoolcraft, W. B. (1999). In vitro culture of human blastocysts. In R. Jansen & D. Mortimer (Eds.), *Towards reproductive certainty: Infertility and genetics beyond* (pp. 378–388). Parthenon Press.

Gardner, D. K., & Wale, P. L. (2013). Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertility and sterility*, 99(4), 1062–1072.

Gardner, D. K., Wale, P. L., Collins, R., & Lane, M. (2011). Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(8), 1981–1986.

Genome Reference Consortium. (2009). GRCh37: Genome Reference Consortium human build 37 (GRCh37) [Genome assembly].

Giménez, C., Conversa, L., Murria, L., & Meseguer, M. (2023). Time-lapse imaging: Morphokinetic analysis of in vitro fertilization outcomes. *Fertility and sterility*, 120(2), 218–227.

Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., & Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a011080.

Giuliano, R., Maione, A., Vallefucio, A., Sorrentino, U., & Zuccarello, D. (2023). Preimplantation Genetic Testing for Genetic Diseases: Limits and Review of Current Literature. *Genes*, 14(11), 2095.

Goss, D. M., Vasilescu, S. A., Vasilescu, P. A., Cooke, S., Kim, S. H., Sacks, G. P., Gardner, D. K., & Warkiani, M. E. (2024). Evaluation of an artificial intelligence-facilitated sperm detection tool in azoospermic samples for use in ICSI. *Reproductive biomedicine online*, 49(1), 103910.

Gou, R., & Zhang, X. (2023). Glycolysis: A fork in the path of normal and pathological pregnancy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 37(12), e23263.

Griffin, D.K., & Harton, G.L. (Eds.). (2020). *Preimplantation Genetic Testing: Recent Advances in Reproductive Medicine* (1st ed.). CRC Press.

Halvaei, I., Khalili, M. A., Esfandiari, N., Safari, S., Talebi, A. R., Miglietta, S., & Nottola, S. A. (2016). Ultrastructure of cytoplasmic fragments in human cleavage stage embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(12), 1677–1684.

Hardarson, T., Caisander, G., Sjögren, A., Hanson, C., Hamberger, L., & Lundin, K. (2003). A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Human reproduction* (Oxford, England), 18(2), 399–407.

Hashimoto, S., Morimoto, N., Yamanaka, M., Matsumoto, H., Yamochi, T., Goto, H., Inoue, M., Nakaoka, Y., Shibahara, H., & Morimoto, Y. (2017). Quantitative and qualitative changes of mitochondria in human preimplantation embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(5), 573–580.

He, Y., Wu, J., Dressman, D. C., Iacobuzio-Donahue, C., Markowitz, S. D., Velculescu, V. E., Diaz, L. A., Jr, Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Papadopoulos, N. (2010). Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature*, 464(7288), 610–614.

Healy, D. L., Breheny, S., Halliday, J., Jaques, A., Rushford, D., Garrett, C., Talbot, J. M., & Baker, H. W. (2010). Prevalence and risk factors for obstetric haemorrhage in 6730 singleton births after assisted reproductive technology in Victoria Australia. *Human reproduction* (Oxford, England), 25(1), 265–274.

Hernández Nieto, C. A., Lee, J., Slifkin, R., Duke, M., Luna, M., Copperman, A., Sandler, B., & Flisser, E. (2018). Slow growing embryos biopsied on day 7: What are realistic expectations? *Fertility and Sterility*, 110(2), e72.

Hu, W., Zhang, J., Wu, Z., Wu, Y., Hu, Y., Hu, X., & Cao, J. (2025). Research progress on paternal mitochondrial inheritance: An overview. *Mitochondrion*, 82, 102019.

Huang, W., Li, X., Yang, H., & Huang, H. (2024). The impact of maternal age on aneuploidy in oocytes: Reproductive consequences, molecular mechanisms, and future directions. *Ageing research reviews*, 97, 102292.

Ishihara, O., Kuwahara, A., & Saitoh, H. (2011). Frozen-thawed blastocyst transfer reduces ectopic pregnancy risk: an analysis of single embryo transfer cycles in Japan. *Fertility and sterility*, 95(6), 1966–1969.

Iwasawa, T., Takahashi, K., Goto, M., Anzai, M., Shirasawa, H., Sato, W., Kumazawa, Y., & Terada, Y. (2019). Human frozen-thawed blastocyst morphokinetics observed using time-

lapse cinematography reflects the number of trophectoderm cells. *PloS one*, 14(1), e0210992.

Jiang, V. S., & Bormann, C. L. (2023). Artificial intelligence in the in vitro fertilization laboratory: a review of advancements over the last decade. *Fertility and sterility*, 120(1), 17–23.

Johnson M. H. (2019). A short history of in vitro fertilization (IVF). *The International journal of developmental biology*, 63(3-4-5), 83–92.

Khalili, M. A., Mardanian, F., Razavi, V., & Esfandiari, N. (2008). The predictive value of pronuclear morphology screening on embryo development and pregnancy outcome in ART cycles. *Middle East Fertility Society Journal*, 13(1), 44–51.

Kim, J. W., Lee, W. S., Yoon, T. K., Seok, H. H., Cho, J. H., Kim, Y. S., Lyu, S. W., & Shim, S. H. (2010). Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC medical genetics*, 11, 153.

Kirkegaard, E. O. W. (2023). Can we pick the best sperm? *Clear Language, Clear Mind*.

Klimczak, A. M., Pacheco, L. E., Lewis, K. E., Massahi, N., Richards, J. P., Kearns, W. G., Saad, A. F., & Crochet, J. R. (2018). Embryonal mitochondrial DNA: relationship to embryo quality and transfer outcomes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(5), 871–877.

Klinge C. M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 105(6), 1342–1351.

Kop, P. A., Mochtar, M. H., O'Brien, P. A., Van der Veen, F., & van Wely, M. (2018). Intrauterine insemination versus intracervical insemination in donor sperm treatment. *The Cochrane database of systematic reviews*, 1(1), CD000317.

Kupka, M. S., Chambers, G. M., Dyer, S., Zegers-Hochschild, F., de Mouzon, J., Ishihara, O., Banker, M., Jwa, S. C., Fu, B., Elgindy, E., Baker, V., & Adamson, G. D. (2024). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology world report: assisted reproductive technology, 2015 and 2016. *Fertility and sterility*, 122(5), 875–893.

Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Margreiter, R., Grimm, M., Hagenbuchner, J., & Ausserlechner, M. J. (2019). The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(10), 454.

Lane, N., & Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, 467(7318), 929–934.

Letchuman, S. (2018). Short introduction of DNA barcoding. *International Journal of Research*, 5(4), 673–686.

Lee, A., & Kiessling, A. A. (2017). Early human embryos are naturally aneuploid-can that be corrected?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(1), 15–21.

Leese H. J. (2002). Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 24(9), 845–849.

Letchuman, S. (2018). Short introduction of DNA barcoding. *International Journal of Research*, 5.

Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*, 6, 19.

Lin, D. P., Huang, C. C., Wu, H. M., Cheng, T. C., Chen, C. I., & Lee, M. S. (2004). Comparison of mitochondrial DNA contents in human embryos with good or poor morphology at the 8-cell stage. *Fertility and sterility*, 81(1), 73–79.

Liu, S., Li, Y., Feng, H. L., Yan, J. H., Li, M., Ma, S. Y., & Chen, Z. J. (2010). Dynamic modulation of cytoskeleton during in vitro maturation in human oocytes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 203(2), 151.e1–151.e1517.

Liu, X., Wang, X., & Qian, R. (2025). Application of machine learning in cell detection. *Targets*, 3(1), 2.

Lledo, B., Ortiz, J. A., Morales, R., García-Hernández, E., Ten, J., Bernabeu, A., Llácer, J., & Bernabeu, R. (2018). Comprehensive mitochondrial DNA analysis and IVF outcome. *Human reproduction open*, 2018(4), hoy023.

Lukaszuk, K., & Podolak, A. (2022). Does Trophectoderm Mitochondrial DNA Content Affect Embryo Developmental and Implantation Potential?. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5976.

Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S. M., Chien, Y. H., Hwu, W. L., Fan, P. C., Wong, L. J., Atwal, P. S., & Huang, T. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), 13039–13044.

Luo, W., Zheng, Y. M., Hao, Y., Zhang, Y., Zhou, P., Wei, Z., Cao, Y., & Chen, D. (2023). Mitochondrial DNA quantification correlates with the developmental potential of human euploid blastocysts but not with that of mosaic blastocysts. *BMC pregnancy and childbirth*, 23(1), 447.

Magli, M. C., Gianaroli, L., & Ferraretti, A. P. (2010). Oocyte quality in poor responders. Presented at the ESHRE Special Interest Group meeting, Bologna, Italy.

Mantikou E, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1822(12):1921-30.

Martin R. H. (2008). Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reproductive biomedicine online*, 16(4), 523–531.

Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356.

May-Panloup, P., Boguenet, M., Hachem, H. E., Bouet, P. E., & Reynier, P. (2021). Embryo and Its Mitochondria. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(2), 139.

May-Panloup, P., Chrétien, M. F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthiery, Y., & Reynier, P. (2005). Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(3), 593–597.

May-Panloup, P., Vignon, X., Chrétien, M. F., Heyman, Y., Tamassia, M., Malthiery, Y., & Reynier, P. (2005). Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 3, 65.

Mertens, J., Regin, M., De Munck, N., Couvreur de Deckersberg, E., Belva, F., Sermon, K., Tournaye, H., Blockeel, C., Van de Velde, H., & Spits, C. (2022). Mitochondrial DNA variants segregate during human preimplantation development into genetically different cell lineages that are maintained postnatally. *Human molecular genetics*, 31(21), 3629–3642.

Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 785, 108320.

Monnot, S., Samuels, D. C., Hesters, L., Frydman, N., Gigarel, N., Burlet, P., Kerbrat, V., Lamazou, F., Frydman, R., Benachi, A., Feingold, J., Rotig, A., Munnich, A., Bonnefont, J. P., & Steffann, J. (2013). Mutation dependance of the mitochondrial DNA copy number in the first stages of human embryogenesis. *Human molecular genetics*, 22(9), 1867–1872.

Montag, M., Köster, M., Strowitzki, T., & Toth, B. (2013). Polar body biopsy. *Fertility and sterility*, 100(3), 603–607.

Morris, J., Brezina, P., & Kearns, W. (2021). The rate of aneuploidy and chance of having at least one euploid tested embryo per IVF cycle in 21,493 preimplantation genetic screening for aneuploidy (PGT-A) tested embryos as determined by a large genetic laboratory. *Fertility and Sterility*, 116(1), e15.

Mouli, P. K., Twig, G., & Shirihai, O. S. (2009). Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophysical journal*, 96(9), 3509–3518.

Moutou, C., Goossens, V., Coonen, E., De Rycke, M., Kokkali, G., Renwick, P., SenGupta, S. B., Vesela, K., & Traeger-Synodinos, J. (2014). ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(5), 880–903.

Nagy, Z. P., Shapiro, D., & Chang, C. C. (2020). Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment. *Fertility and sterility*, 113(2), 241–247.

Oh-hama T. (1997). Evolutionary consideration on 5-aminolevulinate synthase in nature. *Origins of life and evolution of the biosphere : the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*, 27(4), 405–412.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet (London, England)*, 340(8810), 17–18.

Palter, S., Meseguer, M., Santos, J., Romero, J., & Pellicer, A. (2016). First ever “5k” ultra-HD highest resolution video imaging of gametes and embryos: Pilot study for morphological assessment. *Fertility and Sterility*, 106(3), e223–e224.

Parks, J., Haywood, M., McCallie, B., Henry, L., Schoolcraft, W., & Katz-Jaffe, M. (2021). The interplay between nuclear meiotic errors and mitochondrial DNA content drive oocyte aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 116(Supplement 1), e410.

Pellestor, F., Andréo, B., Arnal, F., Humeau, C., & Demaille, J. (2002). Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(8), 2134–2145.

Podolak, A., Woclawek-Potocka, I., & Lukaszuk, K. (2022). 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*, 11(5), 797.

Rabinowitz, M., Potter, D., Demko, Z., Gemelos, G., & Keller, J. (2011). Concordance between day 3 and day 5 biopsy results: Using 24-chromosome aneuploidy screening method. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1511–1514.

Razik, A. A. A., El Hamshary, M. O., Mohamed, M. M., Khamiss, O. A., & Soliman, Y. A. (2016). Correlation between cell-free mitochondrial DNA content of embryo culture medium and human embryo fragmentation and grading. *International Journal of Advanced Research*, 4, 892–902.

Reynier, P., May-Panloup, P., Chrétien, M. F., Morgan, C. J., Jean, M., Savagner, F., Barrière, P., & Malthiery, Y. (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular human reproduction*, 7(5), 425–429.

Rossi, A., Pizzo, P., & Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1866(7), 1068–1078.

Rossier M. F. (2006). T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell calcium*, 40(2), 155–164.

Russo, C. D., Di Giacomo, G., Cignini, P., Padula, F., Mangiafico, L., Mesoraca, A., D'Emidio, L., McCluskey, M. R., Paganelli, A., & Giorlandino, C. (2014). Comparative study of aCGH and Next Generation Sequencing (NGS) for chromosomal microdeletion and microduplication screening. *Journal of prenatal medicine*, 8(3-4), 57–69.

Schaeffer, E., Porchia, L., López-Luna, A., Hernández, D., & López-Bayghen, E. (2018). Aneuploidy rates inversely correlate with implantation during in vitro fertilization procedures: In favor of PGT. *IntechOpen*.

Scott, K. L., Hong, K. H., & Scott, R. T., Jr (2013). Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertility and sterility*, 100(3), 608–614.

Scott L. (2003). Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive biomedicine online*, 6(2), 201–214.

Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., & Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(11), 2394–2403.

Scott, R. T., Jr, Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T., & Treff, N. R. (2013). Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and sterility*, 100(3), 624–630.

Sen, D., Nandakumar, D., Tang, G. Q., & Patel, S. S. (2012). Human mitochondrial DNA helicase TWINKLE is both an unwinding and annealing helicase. *The Journal of biological chemistry*, 287(18), 14545–14556.

Spikings, E. C., Alderson, J., & St John, J. C. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of reproduction*, 76(2), 327–335.

St John J. (2014). The control of mtDNA replication during differentiation and development. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(4), 1345–1354.

St John, J. C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., & Salah, R. (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human reproduction update*, 16(5), 488–509.

Štimac, I. i Martinković, F. (2021). Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija. *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 29 (3), 0-0.

Takeuchi K. (2020). Pre-implantation genetic testing: Past, present, future. *Reproductive medicine and biology*, 20(1), 27–40.

Taylor, T. H., Gilchrist, J. W., Hallowell, S. V., Hanshew, K. K., Orris, J. J., Glassner, M. J., & Wininger, J. D. (2010). The effects of different laser pulse lengths on the embryo biopsy procedure and embryo development to the blastocyst stage. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(11), 663–667.

Thomas, C., Cavazza, T., & Schuh, M. (2021). Aneuploidy in human eggs: contributions of the meiotic spindle. *Biochemical Society transactions*, 49(1), 107–118.

Thouas, G. A., Trounson, A. O., & Jones, G. M. (2005). Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury. *Biology of reproduction*, 73(2), 366–373.

Thundathil, J., Filion, F., & Smith, L. C. (2005). Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos. *Molecular reproduction and development*, 71(4), 405–413.

Tsai, V. F., Zhuang, B., Pong, Y. H., Hsieh, J. T., & Chang, H. C. (2020). Web- and Artificial Intelligence-Based Image Recognition For Sperm Motility Analysis: Verification Study. *JMIR medical informatics*, 8(11), e20031.

Van Blerkom J. (2004). Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction (Cambridge, England)*, 128(3), 269–280.

Van Der Kelen, A., Li Piani, L., Mertens, J., Regin, M., Couvreur de Deckersberg, E., Van de Velde, H., Sermon, K., Tournaye, H., Verpoest, W., Hes, F. J., Blockeel, C., & Spits, C. (2024). The interplay between mitochondrial DNA genotypes, female infertility, ovarian response, and mutagenesis in oocytes. *Human reproduction open*, 2025(1), hoae074.

Victor, A. R., Brake, A. J., Tyndall, J. C., Griffin, D. K., Zouves, C. G., Barnes, F. L., & Viotti, M. (2017). Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertility and sterility*, 107(1), 34–42.e3.

Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. W. (2013). *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level* (4th ed., pp. 582–584). John Wiley & Sons.

Wang, J., Diao, Z., Zhu, L., Zhu, J., Lin, F., Jiang, W., Fang, J., Xu, Z., Xing, J., Zhou, J., Wang, S., Zhang, N., & Chen, L. (2021). Trophectoderm Mitochondrial DNA Content Associated with Embryo Quality and Day-5 Euploid Blastocyst Transfer Outcomes. *DNA and cell biology*, 40(5), 643–651.

Wang, X., Wang, L., & Xiang, W. (2023). Mechanisms of ovarian aging in women: a review. *Journal of ovarian research*, 16(1), 67.

Woods, D. C., Khrapko, K., & Tilly, J. L. (2018). Influence of Maternal Aging on Mitochondrial Heterogeneity, Inheritance, and Function in Oocytes and Preimplantation Embryos. *Genes*, 9(5), 265.

World Health Organization (2018). *International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11)*. Geneva: WHO.

World Medical Association (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191–2194.

Wu, F. S., Weng, S. P., Shen, M. S., Ma, P. C., Wu, P. K., & Lee, N. C. (2021). Suboptimal trophectoderm mitochondrial DNA level is associated with delayed blastocyst development. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 38(3), 587–594.

Yakubovskaya, E., Chen, Z., Carrodegua, J. A., Kisker, C., & Bogenhagen, D. F. (2006). Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *The Journal of biological chemistry*, 281(1), 374–382.

Yang, X., Runge, A., Leung, T., Cedars, M., & Rosen, M. (2016). The development rate of the euploid embryo has a more significant impact on implantation than morphology. *Fertility and Sterility*, 106(3), e338.

Yu, Y., Dumollard, R., Rossbach, A., Lai, F. A., & Swann, K. (2010). Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *Journal of cellular physiology*, 224(3), 672–680.

Zhang, D., Keilty, D., Zhang, Z. F., & Chian, R. C. (2017). Mitochondria in oocyte aging: current understanding. *Facts, views & vision in ObGyn*, 9(1), 29–38.

Zhang, M., Bu, T., Tian, H., Li, X., Wang, D., Wan, X., Wang, Q., Mao, X., & La, X. (2019). Use of Cumulative Live Birth Rate per Total Number of Embryos to Calculate the Success of IVF in Consecutive IVF Cycles in Women Aged  $\geq 35$  Years. *BioMed research international*, 2019, 6159793.

Zhang, Q., Ji, H., Shi, J., Wang, L., Ding, L., Jiang, Y., Huang, X., Qiu, P., & Li, P. (2021). Digital PCR Detection of mtDNA/gDNA Ratio in Embryo Culture Medium for Prediction of Embryo Development Potential. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 14, 521–531.

Zhang, W., & Wu, F. (2023). Effects of adverse fertility-related factors on mitochondrial DNA in the oocyte: a comprehensive review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 21(1), 27.

Zhang, Y., Qu, Y., Gao, K., Yang, Q., Shi, B., Hou, P., & Ji, M. (2015). High copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts good prognosis in glioma patients. *American journal of cancer research*, 5(3), 1207–1216.

Zhao, Y., Brezina, P., Hsu, C. C., Garcia, J., Brinsden, P. R., & Wallach, E. (2011). In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *Biochimica et biophysica acta*, 1810(9), 843–852.

## 8. ŽIVOTOPIS AUTORA

Ivo Karač, rođen je 21.09.1985. u Dubrovniku, od majke Doroty Karač i oca Mihovila Karača. Prirodoslovno-matematičku Gimnaziju Dubrovnik završio je 2004. godine. Iste godine upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna biologija te završava studij i diplomira pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić 2012. godine. Poslovni put započinje 2013. godine stručnim osposobljavanju u Laboratoriju za humanu reprodukciju Kliničke bolnice Sveti Duh, gdje stječe esencijalna profesionalna znanja. Po završetku stručnog osposobljavanja, 2015. odlazi u inozemstvo i nastavlja raditi kao klinički embriolog, a kasnije kao senior klinički embriolog u IVF laboratoriju Pacific Fertility Institute, Sjevernomarijansko Otočje, SAD, do kraja 2022. godine. Početkom 2023. osniva tvrtku i obnaša dužnost izvršnog direktora New Ragusa Corporation, Sjevernomarijansko otočje, SAD, kojoj su osnovne djelatnosti znanstvene konzultantske usluge vezane uz kliničku embriologiju i kriotransport reproduktivnih materijala. Od 2023. godine do danas, surađuje sa Saipan IVF Center, Sjevernomarijansko otočje, SAD, gdje djeluje kao konzultant i voditelj IVF laboratorija. Tijekom godina prošao je brojne stručne edukacije u inozemstvu te je certificirani embriolog od strane American Society for Reproductive Medicine. Član je American Society for Reproductive Medicine, American Association of Bioanalysts, College of Reproductive Biology i International Society of Reproductive Genetics. Kao uže područje interesa navodi kliničku embriologiju, predimplantacijsku genetičku dijagnostiku, genetiku, kriobiologiju, biotehnologiju, botaniku i teorijsku biologiju. Autor je 1 i koautor 1 znanstvenog rada s međunarodnom recenzijom citiranih u SCIE i CC bazi te je koautor 2 pismena i 1 usmenog kongresnog priopćenja. Ponosni je otac Gabriele Kai i Borne Pava te suprug Aleksandre Karač.

Objavljenje publikacije:

Karač, I., Ramsey, G. G., Gračan, R., Vujisić Živković, S., & Bodulić, K. (2025). Association of mitochondrial DNA content and embryo morphology in fully expanded euploid blastocysts. *Human fertility (Cambridge, England)*, 28(1), 2501547.

Oršolić, N., Karač, I., Sirovina, D., Kukolj, M., Kunštić, M., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., & Štajcar, D. (2016). Chemotherapeutic potential of quercetin on human bladder cancer cells. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 51(9), 776–781.