

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Mariana Svobodová

Úloha mitochondriální DNA v reprodukci
The role of mitochondrial DNA in reproduction

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Praha, 2024

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3.1.2024

.....
Mariana Svobodová

Poděkování

Mé největší poděkování patří mé školitelce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za odborné vedení a velkou podporu při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala ve studiu, a především své dceři Berenice Crkové za neustálý přísun pozitivní energie.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zaměřuje na roli mitochondriální DNA (mtDNA) v reprodukci člověka, zejména pak popisuje rozdíly v dynamice mtDNA v oogenezi, spermatogenezi a raném vývoji embrya. Fyziologická funkce mtDNA je doplněna jejími patologiemi a jejich vlivem na fertilitu a schopnost embrya se úspěšně implantovat. Dále je v práci rozvedena možnost využití mtDNA jakožto biomarkeru při hodnocení kvality spermií, vajíček a embryí. Tyto poznatky jsou velmi podstatné zejména při asistované reprodukci, kdy je cílem vybrat nejkvalitnější embrya s vysokou schopností implantace. Práce se také krátce zmiňuje o přítomnosti volné mtDNA v krvi matky a její souvislosti s rozvojem preeklampsie.

Klíčová slova: mtDNA, mitochondrie, reprodukce, (ne)plodnost

ABSTRACT

The bachelor's thesis focuses on the role of mitochondrial DNA (mtDNA) in human reproduction, especially describing the differences in mtDNA dynamics in oogenesis, spermatogenesis and early embryo development. The physiological function of mtDNA is complemented by its pathologies and their effect on fertility and the ability of the embryo to implant successfully. Furthermore, mtDNA is discussed as a possible diagnostic marker in the evaluation of the quality of sperm, eggs and embryos. These findings of these studies are especially significant for assisted reproduction, where the goal is to select the highest quality embryo with the greatest implantation potential. The work also briefly mentions the presence of cell free mtDNA in the mother's blood and its connection with the development of preeclampsia.

Key words: mtDNA, mitochondria, reproduction, (in)fertility

SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
AMH	Anti-Mülleriánský hormon
ATP	adenosintrifosfát
BMI	body mass index
bp	páry bazí
cf-DNA	volná DNA
cf-mtDNA	volná mitochondriální DNA
cf-nDNA	volná jaderná DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
endoG	endonukleáza G
FNDC-1	receptor mitofágie ve spermiích <i>C. elegans</i>
FSH	folikulostimulační hormon
FUNDC1	receptor mitofágie ve spermiích člověka
G	guanin
gDNA	genomická DNA
HVR	hypervariabilní region
ICSI	intracytoplasmatická injekce spermie
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
mtDNA	mitochondriální DNA
mtDNA/gDNA	poměr mtDNA a genomické DNA
mtDNAcn	počet kopií mtDNA
nDNA	jaderná DNA
PCOS	syndrom polycystických ovarií
PE	preeklampsie
PHB	prohibitin
POLG	DNA polymeráza gama
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxid dismutáza
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A
TLR9	toll-like receptor 9
tRNA	transferová RNA

OBSAH

1 Úvod	1
2 Základní informace o mtDNA a její funkci	2
2.1 Jak vypadá mtDNA – srovnání s nDNA (rozdíly)	2
2.2 Respirační řetězec a tvorba ATP	3
2.3 Základní patologie mtDNA.....	4
2.3.1 Počet kopií mtDNA.....	4
2.3.2 Delece.....	4
2.3.3 Substituce.....	5
3 Dědičnost mtDNA.....	6
3.1 Maternální dědičnost mtDNA.....	6
3.2 Degradace paternální mtDNA po oplození.....	6
3.3 Porovnání množství mitochondrií ve spermích a oocytech	7
4 Počet kopií mtDNA a jeho vliv na fertilitu a vývoj embrya	9
4.1 Souvisí počet kopií mtDNA s delecemi?	9
4.1.1 Delece u spermíí.....	9
4.1.2 Delece u vajíček.....	10
4.1.3 Delece u embryí	10
4.2 mtDNAcn u oogeneze	11
4.2.1 Počet kopií mtDNA a maternální věk.....	11
4.2.2 mtDNAcn a ovariální rezervy	12
4.2.3 mtDNAcn u syndromu polycystických ovaríí	13
4.3 Počet kopií mtDNA u spermatogeneze	14
4.3.1 Počet kopií mtDNA a souvislost s věkem otce.....	15
4.3.2 Fragmentace DNA a počet kopií mtDNA.....	15
4.4 Počet kopií mtDNA v raných fázích vývoje embrya	15
4.4.1 Kinetika počtu mtDNA po oplození.....	16
4.4.2 Schopnost implantace blastocysty.....	17
4.5 Využití kvantifikace mtDNA v diagnostice	17
5 Volná mitochondriální DNA – cf-mtDNA.....	19
5.1 Volná DNA v kultivačním médiu při IVF.....	19
5.2 cf-mtDNA ve folikulární tekutině.....	19
5.3 Preeklampsie	20

6 Souhrn	22
7 Závěr	23
8 Seznam použité literatury	24

1 Úvod

Mitochondrie je buněčná organela přítomná v každé buňce v mnoha kopiích. Uvnitř této organely se nachází deoxyribonukleová kyselina (DNA), ve které se mohou podobně jako v jaderné DNA (nDNA) vyskytovat a hromadit mutace. Vzniklé patologie mají následně vliv na fungování buňky samotné, ale i celého organismu.

Mitochondriální genom je ve srovnání s genomem jádra výrazně menší, jeho význam je ale nezanedbatelný. Při diagnostice mnohých onemocnění se setkáváme s genetickými vyšetřeními, která se však v naprosté většině případů zaměřují na jadernou DNA, zatímco mitochondriální DNA (mtDNA) je často poněkud opomíjena. Pokud by byla role mtDNA ve funkčnosti buněk plně pochopena, bylo by možné tuto molekulu použít nejen jako marker při diagnostice řady onemocnění, ale i jako terapeutický prostředek při léčbě infertility.

Dynamika mtDNA (změny v počtu jejích kopií v čase) je odlišná ve spermích, vajíčkách i embryu. Mitochondriální DNA má rovněž odlišný osud v závislosti na původu, přičemž paternální mtDNA zaniká a potomek ji nedědí. To i mnohé další je podstatné pro funkčnost celého procesu vývoje pohlavních buněk, oplození, implantace a následného vývoje embrya.

Cílem této práce je shrnout aktuální poznatky o mtDNA a její roli v reprodukci člověka. mtDNA je významnou molekulou, která by mohla pomoci nejen v diagnostice infertility, ale rovněž by mohla být využívána jako terapeutický prostředek při její léčbě.

2 Základní informace o mtDNA a její funkci

2.1 Jak vypadá mtDNA – srovnání s nDNA (rozdíly)

mtDNA je molekula DNA, která se vyskytuje v eukaryotických buňkách v endosymbioticky vniklých organelách, mitochondriích. Díky svému prokaryotickému původu má tato molekula mnoho odlišností oproti jaderné DNA.

mtDNA je dvouřetězcová cyklická molekula s délkou 16,5 kb, která obsahuje 37 genů. Tyto geny jsou nezbytné pro správné fungování mitochondrie. Jde o 24 genů pro nekódující ribonukleovou kyselinu (RNA) a 13 genů kódujících proteiny. Mnoho genů, které byly původně kódovány v této molekule, se ale v průběhu evoluce přesunulo do jádra a z mtDNA zmizely. Z tohoto důvodu můžeme mitochondrii nazývat semiautonorní organelou, jelikož obsahuje vlastní molekulu DNA, která si sama řídí svou replikaci, neobsahuje ale všechny geny nezbytné pro její funkci, a potřebuje tak využívat další složky buněčného aparátu.

Kromě sekvencí kódujících geny obsahuje mitochondriální DNA i nekódující oblasti. Jde o hypervariabilní regiony I a II (HVR I a II). Tyto regiony obsahují poly(C) oblasti, které se u různých jedinců liší svou délkou. U HVR navíc můžeme pozorovat tzv. délkovou heteroplasmii, tedy přítomnost různě dlouhých poly(C) oblastí u jednoho jedince (Santos et al., 2008).

Jaderná DNA má proti mtDNA vyšší schopnost reparace díky přítomnosti celé mašinérie opravných mechanismů. Tuto schopnost má mtDNA značně limitovanou a na základě toho podléhá častějším mutacím než nDNA. Ve studiích s *Drosophila melanogaster* bylo popsáno, že mtDNA má asi 10× vyšší mutační rychlost než jaderná DNA, přičemž nejčastějšími mutacemi jsou jednonukleotidové substituce G→A (Haag-Liautard et al., 2008). Ke zvýšené frekvenci mutací v mtDNA přispívá i absence histonů, které mají v nDNA na jejich vznik protektivní vliv.

Dalším podstatným a velmi studovaným rozdílem proti nDNA je počet kopií DNA (mtDNA_{cn}) na buňku. Mitochondriální DNA se v buňkách vyskytuje v různém množství kopií. Jelikož mitochondrie slouží jako zdroj adenosintrifosfátu (ATP) pro buňku, počet jejích kopií zpravidla odráží energetické potřeby dané buňky. Energeticky více vytížená buňka tedy obsahuje větší množství mitochondrií a mtDNA.

Za podstatný rozdíl ve zmiňovaných molekulách můžeme považovat i odlišnou dědičnost. Jaderná DNA ve vzniklém embryu pochází vždy od obou rodičů a nově vzniklý organismus tak obsahuje zcela unikátní jadernou genetickou informaci vzniklou kombinací maternálního a paternálního genomu. Toto tvrzení ale pro mitochondriální DNA neplatí. mtDNA v embryu je striktně maternálního původu (pomineme-li naprosto výjimečné případy, kde díky defektu mitochondriální endonukleázy G (endoG) došlo k biparentálnímu přenosu (Luo et al., 2018) – tato situace bude podrobněji popsána v kapitole 3.2), což má velkou roli zejména v případech, kdy je otec přenašečem mitochondriální mutace a potomek tudíž nezdědí defektní genotyp. Tato skutečnost může zároveň sloužit pro mapování migrace populací

a je možné dohledat posledního společného předka současných lidí po mateřské linii – tzv. mitochondriální Evu. K mapování migrace je nejčastěji využívána HVR I a II. Mutace v této oblasti totiž nemají vliv na životaschopnost jedince a nepodléhají tak selekčnímu tlaku, mají tedy i vyšší mutační rychlost než oblasti kódující (Sherry et al., 1994).

Významným jevem v dědičnosti mtDNA je heteroplazmie. Jde o situaci, kdy buňky jedince obsahují mitochondrie dvojího typu – tzv. wild type mitochondrie (běžně se v populaci vyskytující mitochondrie bez mutací) a mutované mitochondrie. Výsledný fenotyp vždy záleží na počtu mutovaných a nemutovaných organel. Aby došlo k expresi mutantního fenotypu, musí být překročen práh (poměr mutovaných a nemutovaných mitochondrií, při kterém dojde k projevení mutace). Defektní fenotyp se tak může exprimovat i u potomka zcela zdravé ženy.

2.2 Respirační řetězec a tvorba ATP

Jednou z hlavních funkcí mitochondrie je tvorba ATP. Pro tuto schopnost je podstatné, aby fungoval respirační řetězec a nedocházelo k hromadění reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou buňku značně poškozovat.

Respirační řetězec se skládá ze 4 komplexů, které mezi sebou přenáší elektrony a poskytují tak energii pro tvorbu protonového gradientu. Ten se ustavuje díky pumpování vodíkových kationtů z mitochondriální matrix do intermembránového prostoru mitochondrie. Na vnitřní mitochondriální membráně je přítomna ATP syntáza, která je schopná protony opět přesouvat do matrix za vzniku ATP. Právě poruchy respiračního řetězce mohou být spojeny s mitochondriální dysfunkcí, která může být jednou z příčin infertility.

Při mutacích v genech pro ATP syntázu u embrya dochází ke změně množství ATP, což je zásadní pro jeho životaschopnost (Sayed et al., 2021). Byla nalezena embrya se zvýšeným množstvím mitochondrií, která ale obsahovala nižší koncentrace ATP (Ye et al., 2020). Zmnožení mitochondrií by tak mohlo být kompenzačním mechanismem, kterým se buňka snaží zvýšit množství produkovaného ATP. Ve spermiích je nejčastější mutací spojenou s infertilitou delece dlouhá 4977 bp, která vede ke snížení aktivity ATP syntázy a problémům s motilitou (Derbel et al., 2021). U oocytů vede nedostatek ATP k eliminaci ovulace a tyto oocyty tedy vůbec ovulovány nejsou (St. John, 2002).

Nejčastější poruchy respiračního řetězce jsou spojeny s mutacemi v komplexu I, který zprostředkovává vstup elektronů do metabolické dráhy (Zhang et al., 2019). S postupným stárnutím můžeme vidět rostoucí množství mutací, což může být jedním z důvodů infertility v pozdějším věku (Babayev et al., 2016).

2.3 Základní patologie mtDNA

mtDNA je výrazně kratší než nDNA, postrádá ale reparační mechanismy, které se vyskytují v jádře, a je tak ke vzniku mutací náchylnější. Obecně lze říct, že k hromadění mutací dochází s věkem a u starších jedinců tak můžeme nalézt více poruch mtDNA, než u mladších. To pochopitelně souvisí s horší kvalitou pohlavních buněk a možnými komplikacemi při oplodnění a vývoji embrya.

2.3.1 Počet kopií mtDNA

Maturovaný oocyt obsahuje přibližně 150 000 kopií mtDNA, u spermií je ale toto číslo výrazně nižší, kolem 100 kopií. Množství ATP potřebné pro normální postimplantační vývoj je ale v obou případech nižší (Wai et al., 2010). U oocytů se počet mtDNA potřebný pro zdárný vývoj pohybuje v rozmezí 40 000 až 50 000, zatímco u spermií vykazovaly zdravý vývoj i takové, které obsahovaly méně než 33 kopií. ATP u spermií je potřebné zpravidla pro jejich motilitu a je využíváno na pohyb bičíku. Po splynutí spermie s oocytem paternální mitochondrie postupně zanikají, až dojde k jejich úplnému vymizení a v embryu zůstávají pouze mitochondrie maternálního původu. U oocytů je naproti tomu množství mtDNA, a tím i vzniklého ATP, podstatné pro vývoj embrya. Podle studie Wai et al. (2010) může dojít k oplození i oocytu s pouhými 4 000 kopiemi mtDNA, takto vzniklé embryo ale zaniká ve stádiu blastocytu a dále se nevyvíjí.

Dle některých studií je možné počet kopií mtDNA použít jako biomarker pro hodnocení kvality vajíček (Taugourdeau et al., 2019), jiné studie ale toto použití vyvrací (Martínez-Moro et al., 2022). Obdobná situace se vyskytuje i u spermií, u kterých je možnost využití počtu kopií mtDNA jakožto biomarkeru kvality spermií rovněž nejasné. Zatímco podle Rosati et al. (2020) by počet kopií mtDNA mohl být vhodným biomarkerem, dle Tiegs et al. (2020) se jako možný marker nejeví. Ohledně použití mtDNA v rámci diagnostiky embryí ve stádiu časně blastocysty bylo rovněž provedeno mnoho studií, jejichž výsledky se spíše přiklání k tomu, že mtDNA vhodným biomarkerem není (Ritu et al., 2022). Více bude problematika biomarkerů rozvedena v kapitole 4.5.

2.3.2 Delece

Další podstatnou patologií, která úzce souvisí s počtem kopií mtDNA, jsou delece. Delece jsou velmi skloňovaným tématem hlavně v souvislosti se spermii, i u oocytů ale mohou mít vliv na plodnost. Stejně jako u mnoha dalších vlivů, i delece v oocytech přibývají s rostoucím věkem a mohou tak sehrávat svou roli ve fertilitě (Gibson et al., 2006). U spermií můžeme dohledat podobných studií více. Delece v mtDNA spermií mohou vést k poruchám motility, zvýšení počtu kopií mtDNA, změně koncentrace spermií a s tím spojeným poruchám plodnosti (Wu et al., 2019a). Je možné, že delece ve spermatické mtDNA by mohly být použity i jako biomarker a jejich množství by mohlo souviset se znečištěním prostředí

(Vozdova et al., 2022). Nejběžnější známou delecí je eliminace 4977 bp mezi pozicemi 8470 a 13447 (Keefe et al., 1995), která může vést k poruchám respiračního řetězce (Ieremiadou & Rodakis, 2009). To má vliv převážně v energeticky vyčerpaných buňkách, kterými spermie bezpochyby jsou.

2.3.3 Substitute

Jak již bylo výše zmíněno, nejčastější mutací v mtDNA jsou jednonukleotidové substitute, a to konkrétně substitute G→A. Zatímco obecně můžeme říct, že mutační rychlost mtDNA je asi 10× vyšší než u nDNA, u substitute G→A je tato rychlost až 70× vyšší v mitochondrii než v jádře (Haag-Liautard et al., 2008). Na rozdíl od indel mutací (inzerce či delece), substitute nevedou k posunu čtecího rámce a díky degeneraci genetického kódu mohou být i zcela bez projevů, a to za předpokladu, že mutovaný triplet kóduje stejnou aminokyselinu jako triplet původní. Nemusí to ale být pravidlem a i tzv. „same sense“ mutace mohou vést k poruchám metabolismu. Díky jevu zvanému kodon bias se totiž v buňce vyskytují antikodony, které nasedají na kódující vlákno DNA a určují zařazení konkrétní aminokyseliny, v různém poměru, což může vést ke zpomalení nebo urychlení vzniku produktu. To se pak může odrazit na metabolických drahách buňky, a i takováto na první pohled „tichá mutace“ může mít na fungování buňky výrazný dopad.

3 Dědičnost mtDNA

3.1 Maternální dědičnost mtDNA

Různé druhy živočichů mají odlišné způsoby přenosu mtDNA. Zatímco u některých druhů můžeme vidět dědičnost biparentální (a to i u běžně používaných modelových organismů, jako například u myši nebo ovce), pro člověka platí, že potomek dědí mitochondrie pouze z mateřské linie (Vissing, 2019). Tento fakt je podstatný zejména při stanovování rizika přenosu mitochondriálně dědičné choroby, jelikož z paternální strany se mutantní fenotyp nedědí. Problém pak nastává v momentě, kdy je mitochondriálně dědičnou chorobou postižena matka, je zde totiž vysoké riziko přenosu na potomka. Kolem roku 2016 se proto poprvé provedla u embrya výměna mutovaných maternálních mitochondrií za mitochondrie dárcovské (Zhang et al., 2017a). Vzniklé embryo pak obsahovalo DNA od tří různých lidí. Jaderná informace v embryu byla vytvořena kombinací DNA biologických rodičů a mtDNA pocházela od zdravé dárkyně – můžeme tedy mluvit o „dítěti tří rodičů“. Tento postup by mohl být používán při asistované reprodukci za předpokladu, že hrozí riziko přenosu mutace na potomka. Je ovšem etická otázka, zda jsou takovéto postupy korektní a mnoho států tyto metody zatím nepodporuje.

3.2 Degradace paternální mtDNA po oplození

mtDNA pocházející od otce se u lidí nedědí. Neznamená to ale, že do oocyty vůbec nevstupuje. Mitochondrie ve spermii jsou lokalizované v její střední části a po oplození se dostávají do vajíčka. Během několika málo buněčných dělení však dojde k jejich postupné degradaci. Mechanismus této degradace se liší v rámci různých živočišných druhů, zároveň k úplnému vymizení paternální mtDNA dochází v různých stádiích. U člověka je mtDNA odbourána během časně embryogeneze, konkrétně do stádia dvou až čtyřbuněčného embrya (Sutovsky et al., 1999). Osmibuněčné embryo (za předpokladu, že nemluvíme o patologické situaci) již paternální mtDNA neobsahuje. Tento proces je odlišný například u myši, u kterých můžeme pozorovat přítomnost paternální mtDNA u potomků (Luo et al., 2013).

Ohledně degradace otcovských mitochondrií existují dva odlišné modely. První model můžeme volně přeložit jako „model zředění“. Podle tohoto modelu, a studie provedené na myších modelech, můžeme u potomků nalézt paternální mtDNA ve velmi malém množství. To je dané obrovským nepoměrem počtu mitochondrií ve spermii a ve vajíčku. Malé množství otcovských mitochondrií se tak jednoduše „vyřadí“ ve velkém množství mitochondrií maternálních (Gyllensten et al., 1991). Druhý model můžeme nazvat modelem „aktivní degradace“. Tento model naopak předpokládá, že dochází ke kompletnímu odbourání paternální mtDNA, ať už před oplozením, nebo po oplození. Mitochondrie od otce tak u potomka nalezeny být vůbec nemohou (Sato & Sato, 2013).

Podle modelu aktivní degradace dochází k označení paternálních mitochondrií ubiquitinem. Tyto mitochondrie jsou následně selektivně odbourány proteolytickou drahou pomocí proteasomu a ve zhruba čtyřbuněčném stádiu již mitochondrie pocházející od otce nejsou detekovatelné (Sutovsky et al., 1999). Ve spermiích je hojně exprimován receptor mitofágie FUNDC1, díky kterému jsou otcovské mitochondrie degradovány. Tento receptor se totiž nevyskytuje v samičích mitochondriích a paternální mitochondrie tak mohou být jednoduše rozpoznány a označeny. Ortologem tohoto receptoru je FNDC-1 u *C. elegans*, u které byly prováděny studie týkající se degradace paternální mtDNA (Lim et al., 2019). Na eliminaci mtDNA se dále podílí i endonukleáza G, jejíž patologie vedou k biparentální dědičnosti mtDNA, jak bylo zmíněno v předchozí kapitole.

Ačkoliv obecně můžeme tvrdit, že paternální mitochondrie potomek nedědí, i zde můžeme nalézt výjimky. Byly popsány případy, kdy člověk nesl jak mitochondrie maternální, tak mitochondrie paternální (Luo et al., 2018). Přítomnost obou rodičovských mitochondrií nemusí být vidět ve všech buňkách organismu, ale může být selektivně pouze v konkrétní tkáni. Důvodem degradace paternálních mitochondrií je jejich ubiquitinace a činnost mitochondriální endonukleázy G. Při defektu endoG tak můžeme pozorovat přenos paternálních mitochondrií, protože nedošlo k jejich označení a degradaci. Za přítomnost paternální mtDNA u potomka mohou být, kromě defektu endoG, zodpovědné i některé mutace v jaderné DNA (Zhou et al., 2016).

3.3 Porovnání množství mitochondrií ve spermiích a oocytech

Spermie a vajíčka se výrazně liší v množství přítomných mitochondrií, jak již bylo naznačeno. U obou typů gamet můžeme pozorovat spojitost mezi množstvím přítomných mitochondrií a plodností. Mitochondrie ve spermiích (a jimi vytvořené ATP) mají hlavní úlohu v zajištění pohybu bičíku a tím i motility spermie jako takové. Ve vajíčku jsou mitochondrie podstatné pro zajištění energie na dělení vzniklé zygoty. Počet mitochondrií i jejich osud se tedy mezi vajíčkem a spermií velmi liší. Zatímco spermii stačí pro zdárné oplození a následný vývoj embrya jen několik desítek mitochondrií, u oocytů je toto číslo v řádech desetitisíců až stotisíců (Wai et al., 2010). Běžná somatická buňka pak obsahuje přibližně 100 až 1000 mitochondrií.

Motilita spermií není pouze odrazem množství ATP, ale podílí se na ní i glukóza. Při snížení koncentrace glukózy se aktivuje dráha oxidativní fosforylace a vzniká větší množství ATP. S tím souvisí i rychlost pohybu spermií, která byla pozorovaná vyšší u spermií v nižší koncentraci glukózy. Díky snížené koncentraci glukózy dojde k vyšší produkci ATP a zrychlení pohybu spermie (Zhu et al., 2019). Aby se co nejvíce snížilo množství spermatických mitochondrií vstupujících do oocytu, dochází během spermiogeneze k postupnému poklesu jejich počtu až na výsledných několik desítek.

I v oocytu se množství mitochondrií během jeho zrání mění. V průběhu zrání dochází k postupnému nárůstu množství mitochondrií, po dokončení zrání už se ale toto množství nemění a zůstává konstantní (Mahrous et al., 2012). Zvyšování počtu kopií nicméně není spojené s růstem oocytu, ale právě s jeho zráním. Podle studie Mahrous et al. (2012) bylo prokázáno, že v přítomnosti inhibitoru fosfatidylinositol-3-kinázy dochází k zastavení růstu oocytu samotného, počet mitochondrií se ale dále zvyšuje stejně, jako ve skupině oocytů kultivovaných bez inhibitoru. Nebyla tedy pozorována souvislost mezi zvětšováním objemu buňky a nárůstem počtu mitochondrií.

Mitochondriální DNA oocytů prochází dvěma sníženími diverzity mechanismem „hrdla lahve“. K první redukci počtu mitochondrií dochází v průběhu oogeneze, ke druhému během raného vývoje embrya. Během první redukce v primordiálních folikulech je výrazně replikováno malé množství mitochondrií. Tato replikace pokračuje až do stádia maturovaného oocytu. Právě toto snížení a následné pomnožení mitochondrií je zodpovědné za rozdílné exprese mitochondriálně dědičných onemocnění. V průběhu redukce mitochondrií může dojít k vyselektování mutantních mitochondrií a potomek tak může získat výrazně vyšší procento mutantních mitochondrií než matka. Díky tomu se může mitochondriální choroba projevit u potomka zdravé ženy, protože u potomka došlo k překročení prahu a manifestaci onemocnění. Pochopitelně může nastat i opačná situace, kdy dojde k selekci zdravých mitochondrií a potomek tak onemocnění nezdědí (Wai et al., 2008). Zároveň je tento efekt zodpovědný za různou míru heteroplazmie u různých potomků jedné matky. Druhý proces redukce mitochondrií efektem „hrdla lahve“ nastává až po samotném oplození, kdy dochází k dělení zygoty a mitochondrie jsou rozděleny do dceřiných buněk, nedochází ale prozatím k jejich replikaci (Mertens et al., 2022). Počet mitochondrií na buňku tedy postupně klesá a díky náhodné segregaci mitochondrií do dceřiných buněk můžeme později vidět rozdílnou míru heteroplazmie v různých tkáních.

Aby došlo k projevení mitochondriální choroby, musí být překročen práh, tzn. musí být přítomno určité množství mutovaných mitochondrií. Otázkou ale zůstává, zda je podstatný poměr mezi mutovanou a nemutovanou (wild-type) mtDNA, nebo má roli spíše absolutní množství přítomných wild-type mitochondrií. Podle studie Jiang et al. (2017) má podstatnou roli právě absolutní množství nemutované mtDNA. Tato vlastnost by mohla být využita při prevenci vzniku choroby přidáním wild-type mitochondrií.

4 Počet kopií mtDNA a jeho vliv na fertilitu a vývoj embrya

Množství mtDNA hraje podstatnou roli nejen při vývoji gamet, ale i při vzniku zygoty a následném vývoji embrya. Ač některé zdroje referují možnost využití tzv. „počtu kopií mtDNA“ neboli mtDNA copy number jakožto diagnostického markeru, jiné tuto možnost vyvrací. Obecně můžeme říct, že jak pro pohlavní buňky, tak pro embryo, je nutná přítomnost určitého množství mtDNA. Pokud není přítomen dostatek mtDNA (a tím i ATP), nemůže dojít ke zdárnému oplození a vývoji embrya.

4.1 Souvisí počet kopií mtDNA s delecemi?

4.1.1 Delece u spermií

Delece jsou jednou z nejčastějších mutací v mtDNA, které mohou souviset s infertilitou. U mužů se zhoršenými spermatickými parametry bylo nalezeno zvýšené množství mtDNA delecí, zároveň ale jejich spermie obsahovaly vyšší množství mtDNA. Tato, na první pohled možná nelogická situace má ale poměrně jednoduché vysvětlení. Pokud mitochondrie obsahují zvýšené množství delecí, nemohou správně plnit svou funkci a buňka musí tento handicap kompenzovat. Vhodným kompenzačním mechanismem se tak zdá být zvýšená produkce mtDNA a mitochondrií, jako snaha co nejvíce eliminovat dopad mutací (Wu et al., 2019a). Výhodou použití počtu kopií mtDNA a delecí při diagnostice je fakt, že tyto parametry jsou dlouhodobě stabilní. Spermatické parametry, jako je motilita spermií nebo jejich koncentrace, se naproti tomu v čase poměrně mění. Tyto parametry mohou souviset s mnoha vnějšími faktory a mohou být jednoduše ovlivněny v závislosti na životním stylu.

Ve skupině mužů, u kterých bylo nalezeno zvýšené množství mtDNA a delecí, byla pozorována zhoršená schopnost spermií reagovat na oxidační poškození a zároveň u nich byla častá abnormální spermatogeneze (Rosati et al., 2020).

Jednou z podstatných delecí je delece v genu pro protein prohibitin (PHB). Tento protein je ve velké míře exprimován v buňkách bohatých na mitochondrie, vyskytuje se totiž ve vnitřní mitochondriální membráně. PHB hraje důležitou roli v motilitě spermií a jeho exprese by mohla být využita jako marker pro hodnocení jejich kvality. Při delecí v genu pro prohibitin dochází k poškození funkce mitochondrie z důvodu problému s produkcí ATP (Li et al., 2020).

Nejen delece velkého rozsahu, ale i jednonukleotidové delece mohou vést k výraznému snížení plodnosti mužů. Vzhledem k tomu, že delece způsobují posun čtecího rámce (pokud není počet deletovaných aminokyselin dělitelný třemi), je zároveň podstatná i lokalizace dané delecí v genu. Známou mutací je například delece v genu *MT-CYB*, který kóduje komplex III dýchacího řetězce. Díky narušení respiračního řetězce dochází k poruchám motility spermií a tím pádem i problémům s fertilitou (Saleh Jaweesh et al., 2022).

Delece ve spermiích nesouvisí pouze s genetickými faktory, může na ně mít vliv i vnější prostředí. Byla provedena studie, která zkoumala změny v mtDNAcn a v delecích mtDNA

v závislosti na změnách znečištění ovzduší během roku (Vozdova et al., 2022). Sperma bylo odebráno v zimě a v létě stejným mužům a bylo porovnáno množství mitochondriálních delecí a počtu kopií mtDNA. V zimě (období s vyšším znečištěním) bylo ve spermatu nalezeno vyšší množství delecí oproti létu (období s nižším znečištěním), množství mtDNA ale žádné výrazné změny nevykazovalo. Delece mtDNA by tedy mohly být použity jako marker pro hodnocení kvality ovzduší.

4.1.2 Delece u vajíček

Jedním z nejpodstatnějších faktorů pro vznik delecí ve vajíčkách je věk. U oocytů pocházejících od starších jedinců bylo zaznamenáno zvýšené množství mitochondriálních delecí oproti mtDNA mladších jedinců (Hammond et al., 2016). Nejčastější delecí u oocytů je, stejně jako u spermií, delece dlouhá 4977 bp. Tuto delecí, díky které v mitochondrii chybí bezmála třetina mtDNA genomu, můžeme vidět například u pacientek se syndromem polycystických ovarií (PCOS) a lze ji tak použít jako biomarker (Ye et al., 2021). O syndromu polycystických ovarií bude pojednáno v kapitole 4.2.3. Oblast, která je při této mutaci deletována, obsahuje geny pro tRNA a geny pro komplexy I a IV dýchacího řetězce a F_0F_1 -ATP-syntázu. Může tedy způsobit selhání v produkci ATP a mitochondriální dysfunkci.

Zdá se, že oproti ostatním tkáním, obsahují oocyty menší množství mtDNA delecí (Coticchio et al., 2014). To je pravděpodobně způsobeno určitou ochranou buněk před vznikem těchto mutací.

Zkoumání oocytů a vlivu stárnutí na jejich kvalitu je složitější než v případě spermií. Mnohé studie jsou tak omezené na použití zvířecích modelů. V případě využití lidských oocytů může být problém v tom, že jsou k dispozici pouze nekvalitní vajíčka, výsledky takovýchto studií pak mohou být zkreslené oproti realitě (Hammond et al., 2016). Je ale pravděpodobné, a mnohé zvířecí studie to i dokazují, že množství delecí v mtDNA s věkem matky skutečně stoupá. Stejnou situaci můžeme vidět i u jiných, převážně vysoce metabolicky aktivních, tkání. Lze tedy předpokládat, že i v případě oocytů bude možné pozorovat stejný fenomén.

4.1.3 Delece u embryí

Delece v mitochondriální DNA u embryí bývají spojovány s časnou těhotenskou ztrátou (Ye et al., 2020). Právě mtDNA a její poškození nám může poskytnout odpověď na otázku, proč se chromozomálně zdravé embryo neimplantovalo a zaniklo. To je velmi podstatné pro výběr embrya s nejvyšším implantačním potenciálem při asistované reprodukci. Ač by se mohlo zdát, že delece mtDNA v oocyty znamená, že totožná delece bude přítomná i v embryu, není to vždy úplně pravdou. Po fertilizaci totiž dochází k výrazné purifikační selekci, během níž mohou být mitochondrie s poškozením odstraněny, a dále se dělí už pouze mitochondrie s wild-type fenotypem (Stewart et al., 2008). Velké množství delecí přítomných v oocytech

tak nijak negativně neovlivní schopnost implantace budoucího embrya, protože po oplození dojde k „vyčištění“ buněk od mutantních mitochondrií (Ma et al., 2020).

4.2 mtDNAcn u oogeneze

Oogeneze je proces, při kterém dochází ke vzniku a maturaci oocyty ve vaječníku. Tento proces, na rozdíl od mužské spermatogeneze, začíná již v prenatálním období a končí ovulací. Veškeré oocyty, které má žena v zásobě, tak pocházejí z doby před jejím narozením a s postupujícím věkem se v nich hromadí mutace. Starší žena tak má starší oocyty, které déle podléhaly vnějším vlivům a lze předpokládat, že budou obsahovat více patologických změn než oocyty mladé ženy. Mutace se nehromadí pouze v jádře, ale svou roli zde sehrávají i mitochondrie. I v nich totiž dochází k různým změnám (a díky absenci mnoha reparačních mechanismů oproti jádru těchto změn může být dokonce více než v samotném jádře), které následně mohou mít vliv na plodnost a schopnost donosit zdravého potomka. V případě sníženého množství mtDNA v oocytech hrozí nedostatek ATP, což může vést k chybám při segregaci chromozómů a vzniku aneuploidií (Jansen & De Boer, 1998).

V souvislosti s vajíčky a mitochondriemi se často mluví také o ovariálních rezervách, které rovněž souvisí s věkem a podle některých studií vykazují souvislost s množstvím mtDNA (Busnelli et al., 2018). V množství mtDNA přítomné v oocytech však nehraje roli pouze věk, ale svůj podíl zde mají i jiné faktory, jako například přítomnost syndromu polycystických ovarií.

4.2.1 Počet kopií mtDNA a maternální věk

Existuje mnoho studií zabývajících se souvislostí počtu kopií mtDNA s různými faktory, z nichž vycházejí často rozporuplné výsledky. Například podle studie Zhu et al. (2021), ve které bylo použito 319 blastocyst, bylo zjištěno, že jediné faktory, které se podílí na změnách v množství mtDNA, jsou maternální věk, počet antrálních folikulů, progesteron a estradiol.

Na jedné straně stojí názor, že existuje výrazná korelace mezi maternálním věkem a počtem kopií mtDNA, přičemž část poznatků poukazuje na to, že vyšší mtDNAcn je přítomna u žen s nižšími ovariálními rezervami, které pozorujeme u starších žen (Busnelli et al., 2018). Proti tomu ale stojí opačná zjištění, která ukazují na odlišný fenomén a stárnutí spojují naopak s poklesem mtDNAcn (Aoki et al., 2021; Wai et al., 2010; Yang et al., 2020). Pokud porovnáme skupinu oocytů, které se podařilo zdárně oplodnit a dále se vyvíjely v embryo, se skupinou oocytů, které se naopak oplodnit nepovedlo a k jejich dalšímu vývoji nedocházelo, u neoplozených vajíček můžeme vidět menší množství kopií mtDNA než u oocytů oplozených (Santos et al., 2006). Klesající úspěšnost oplození se snižujícím se množstvím kopií mtDNA by tak mohla podporovat spíše tvrzení o poklesu mtDNAcn s rostoucím věkem a asociovat menší pravděpodobnost otěhotnění ve vyšším věku s nižším počtem kopií mtDNA.

Na druhé straně existují výzkumy, které nenašly žádnou souvislost mezi maternálním věkem a množstvím mtDNA (Lukaszuk & Podolak, 2022; Scott et al., 2020) nebo takové, které naopak tvrdí, že ženy ve vyšším věku mají výrazně zvýšenou mtDNAcn (De Munck et al., 2019). Většina prací se ale přiklání k tvrzení, že s rostoucím věkem matky klesá množství mtDNA a tím pádem i produkce ATP. Dle Zhang et al. (2017b) každoročně klesá množství mtDNA o 0,4 kopie, což může stát právě za zhoršenou plodností žen ve vyšším věku.

V přechozí kapitole bylo zmíněno, že s rostoucím množstvím delecí roste i počet kopií mtDNA. Tento fenomén byl pozorován u spermií a pojednává o kompenzačním mechanismu. Podíváme-li se na oogenezi, zůstává otázkou, zda tento mechanismus můžeme aplikovat i na oocyty. V oocytech bylo zjištěno zvýšení počtu delecí s rostoucím věkem. Pokud by i zde docházelo ke kompenzaci nefunkčních mitochondrií zvýšením jejich replikace, viděli bychom u starších žen zvýšení mtDNAcn. Většina současných poznatků se nicméně přiklání k tomu, že s rostoucím věkem ženy množství mtDNA v oocytech klesá. Jaká je tedy skutečná souvislost počtu kopií mtDNA v oocytech a delecemi? Je možné, že díky výrazně vyššímu množství přítomné mtDNA ve srovnání se spermiemi, probíhají v oocytech jiné mechanismy a nefunkčnost mitochondrií není kompenzována jejich zmnožením, ale naopak jejich odstraněním?

4.2.2 mtDNAcn a ovariální rezervy

Ovariálními rezervami rozumíme množství oocytů, které je přítomno ve vaječníku. Toto množství pochopitelně s věkem postupně klesá a může mít vliv na počet mtDNA v oocytech. To dále odráží i pravděpodobnost úspěšného oplození a donošení zdravého potomka. U oocytů pocházejících od myší s nízkými ovariálními rezervami podstupujících *in vitro* fertilizaci (IVF) byla zaznamenána horší úspěšnost oplození a nižší množství mtDNA, než u myší s vyššími rezervami (Jing et al., 2019).

Snížené množství ovariálních folikulů je možné klinicky prokázat pomocí různých biomarkerů. Těmi jsou například Anti-Mülleriánský hormon (AMH), folikulostimulační hormon (FSH) a počet antrálních folikulů. Během studie, při které byly vytvořeny dvě skupiny žen podle velikosti ovariálních rezerv, bylo zjištěno, že skupina s nízkými ovariálními rezervami má v kumulárních buňkách nižší množství mtDNA než kontrolní skupina (Boucret et al., 2015). Jak se zdá, snížení množství mtDNA vykazují dále i polární tělíška v metafázi II u žen staršího věku v porovnání se skupinou mladších žen (Konstantinidis et al., 2014). Při úspěšnosti oplození tedy nejspíš nehraje roli pouze množství mtDNA v samotném oocytu, svou úlohu zde sehrávají i buňky s oocytem funkčně propojené. Je možné, že hlavní roli v tomto procesu ani nehraje samotný oocyt, ale kumulární buňky (Boucret et al., 2015).

Jedním z podstatných markerů ovariálních rezerv se zdá být AMH. Tento hormon je produkován buňkami granulózy a je nepostradatelný při růstu ovariálního folikulu. Jeho tvorba začíná při vzniku primárního folikulu a ustává ve stádiu antrálního folikulu, který má

velikost zhruba 2-6 mm (Durlinger et al., 2001). Produkce AMH přímo souvisí s věkem a jeho množství se postupně snižuje od puberty, kdy dosahuje nejvyšších hodnot, až k neměřitelným hodnotám kolem 50. roku věku (Freeman et al., 2012). Jelikož AMH silně koreluje s velikostí ovariálních rezerv, je proto jedním z nejlepších biomarkerů, které dnes můžeme použít při asistované reprodukci. Podle Bowolaksono et al. (2022) existuje podstatná souvislost mezi mtDNAcn, věkem a množstvím AMH. Výhodou při použití AMH je navíc fakt, že jeho hladina se nemění v závislosti na fázi menstruačního cyklu a jeho hodnoty tak zůstávají konstantní (Hehenkamp et al., 2006). I přes tuto skutečnost ale není možné s jistotou určit ovariální rezervy pouze za použití AMH, ale je potřeba využít i jiné biomarkery, které se na velikosti ovariálních rezerv rovněž podílí.

4.2.3 mtDNAcn u syndromu polycystických ovaríí

PCOS, neboli syndrom polycystických ovaríí, je dědičné onemocnění, které postihuje 5-10 % ženské populace, čímž se řadí mezi nejčastější defekt ovulace. Vezmeme-li folikulární tekutinu pacientek s PCOS, můžeme v ní vidět zvýšené množství celkové volné DNA (cf-DNA) oproti kontrolní skupině, množství volné mitochondriální DNA (cf-mtDNA) je zde ale nižší (Qasemi et al., 2021). Toto snížení je pravděpodobně důsledek nižšího množství mtDNA, které se vyskytuje u žen s PCOS (Shukla et al., 2020). Hladina folikulární cf-mtDNA by mohla být využita jako biomarker, není totiž ovlivněna například věkem pacientky nebo jejím body mass indexem (BMI) (Qasemi et al., 2021).

U skupiny pacientek s PCOS byly provedeny testy kvality embryí v závislosti na tom, zda se jednalo o embrya čerstvá nebo zmrazená. Testování proběhlo pomocí měření poměru mtDNA/gDNA v buňkách a v médiu. V porovnání s kontrolní skupinou měla embrya pocházející od žen s PCOS nižší poměr mtDNA/gDNA v médiu, což může poukazovat na jejich horší kvalitu (Sayed et al., 2021). Poměr mtDNA/gDNA by tak mohl být dalším slibným biomarkerem v rámci hodnocení kvality embrya, jelikož embrya s vyšším poměrem mtDNA/gDNA v médiu mají vyšší pravděpodobnost, že dospějí do stádia blastocysty, než embrya s nižším poměrem (Stigliani et al., 2014). Překvapivě embrya s větším množstvím mtDNA v buňkách jsou méně životaschopná a vykazují nižší implantační potenciál. Tento zdánlivý paradox by podle Diez-Juan et al. (2015) mohl být vysvětlen třeba tím, že nekvalitní embrya uvolňují do média menší množství mtDNA, jelikož většinu potřebují na udržení vlastního vývoje. Embrya, která pokračují ve vývoji do stádia blastocysty, totiž mají v médiu přítomen vyšší poměr mtDNA/gDNA (Stigliani et al., 2014). Poměr mtDNA/gDNA byl dále využit pro hodnocení vlivu kryokonzervace na kvalitu embrya a úspěšnost otěhotnění. Ukázalo se, že čerstvá embrya mají ve svých buňkách vyšší poměr mtDNA/gDNA než embrya zmrazená, ačkoliv nešlo o statisticky významný rozdíl (Sayed et al., 2021).

4.3 Počet kopií mtDNA u spermatogeneze

Není zcela jasné, zda v kvalitě spermatu hraje roli absolutní počet zdravých mitochondrií, nebo je podstatný spíše poměr mutované a nemutované mtDNA. I když by na první pohled mohlo dávat smysl, že podstatný je hlavně poměr mezi wild-type a mutantní mtDNA, zdá se, že podstatnější roli hraje absolutní množství wild-type mtDNA (Jiang et al., 2017). Pokud by skutečnost opravdu byla taková, bylo by možné využít zvýšení wild-type mtDNA jako terapii u mužů s problémy s fertilitou spojenými s přítomností mutací v mtDNA.

V předchozím textu už bylo naznačeno, že u spermií se setkáváme s fenoménem zvýšení mtDNA s rostoucím množstvím delecí. Byla pozorována souvislost s úspěšností při fertilizaci a spermie s vyšší mtDNA vykazovaly nižší úspěšnost při oplození. Spermie s vyšší mtDNA měly obecně horší kvalitu i motilitu, než spermie s normálním množstvím mtDNA. Sperma pacientů navíc mělo nižší koncentraci spermií, které zároveň vykazovaly abnormální morfologii (Wu et al., 2019a). Ve spermatogenezi hraje důležitou roli mitochondriální transkripční faktor A (TFAM) a DNA polymeráza gama (POLG), jejichž snížení vede ke snížení mtDNA (Wu et al., 2019b). Jak TFAM, tak POLG, jsou regulátory mtDNA a jejich methylace vede ke snížení počtu kopií mtDNA. Ač spermie i vajíčka obsahují výrazně vyšší množství kopií mtDNA, než je potřeba pro oplození a zdárný vývoj embrya, je mtDNA kritický parametr pro preimplantaci. Pokud dojde k drastickému poklesu počtu kopií, nedojde k implantaci a embryo se dále nevyvíjí (Chiaratti & Meirelles, 2010).

Ačkoliv můžeme tvrdit, že mtDNA inverzně souvisí s kvalitou spermatu (a při zvýšení mtDNA můžeme často vidět snížení kvality gamet), nebylo shledáno jako vhodný biomarker pro intracytoplazmatickou injekci spermie (ICSI) při IVF. Problémem při této metodě je fakt, že nelze otestovat spermii předtím, než je vpravena do vajíčka, a je nutné otestovat až vzniklé embryo. Není tedy možné na základě mtDNA vybrat vhodnou spermii pro IVF. Pro ICSI se nicméně vybírají motilní spermie, a jelikož motilita inverzně souvisí s mtDNA, je proto pravděpodobné, že normálně pohyblivá gameta nemá zvýšené množství kopií mtDNA (Tiegs et al., 2020). mtDNA sice není možné využít pro ICSI, i přes to nám ale může posloužit pro zhodnocení celkové kvality spermatu (Sun et al., 2022).

Na otázku, proč ve spermiích dochází ke zvýšení počtu kopií mtDNA, existují tři potenciální odpovědi. Prvním vysvětlením je downregulace TFAM a POLG v průběhu spermatogeneze. V průběhu fyziologického zrání spermií dochází k regulaci TFAM a POLG mechanismem negativní zpětné vazby, díky které tyto faktory tlumí expresi sebe sama a snižují tak replikaci mtDNA. Na základě toho má spermie za fyziologických podmínek menší množství mtDNA než vajíčko. Pokud je ale tato dráha narušena a nedochází ke zpětnovazebnému snížení exprese, výsledkem je nárůst mtDNA. Druhou možností je zvýšení kopií v důsledku kompenzačního mechanismu jako reakce na defektní nebo fragmentovanou DNA (Andreu et al., 2009). Třetí teorie je založená na reaktivních formách kyslíku. ROS se hromadí v mitochondriích, což vede ke zvýšení počtu mtDNA kopií a celková nerovnováha v buňce pak vede i k abnormálním spermatickým parametrům (Amaral et al., 2013).

4.3.1 Počet kopií mtDNA a souvislost s věkem otce

Zatímco souvislost změn mtDNAcn v oocytech s rostoucím věkem matky dnes máme podloženou řadou studií, ohledně změn v počtu kopií mtDNA ve spermatogenezi v souvislosti s věkem otce zatím příliš informací nemáme. Ve studii Orszynowicz et al. (2016) prováděné na koních nicméně nebyla nalezena žádná souvislost mezi věkem samce a změnou mtDNAcn.

Je zajímavé, že u žen je rostoucí věk jedním z hlavních důvodů poklesu plodnosti, ačkoliv u mužů podobný trend nepozorujeme. Beze sporu za tímto mechanismem stojí i skutečnost, že mužská spermatogeneze probíhá až od dosažení pohlavní dospělosti a spermie má výrazně kratší živostnost než oocyt. U vajíček se postupně hromadí mutace a s rostoucím věkem těchto změn přibývá, což odráží pokles plodnosti ve vyšším věku ženy. Naproti tomu u mužů vznikají stále nové gamety a hromadění patologických změn v průběhu stárnutí zde tedy není natolik výrazné. Na druhou stranu i u spermií můžeme s rostoucím věkem pozorovat nárůst mutací (a to zejména bodových) z důvodu velkého množství buněčných dělení (Cioppi et al., 2019). Souvislost vyššího věku otce s poklesem plodnosti (s ohledem na mtDNAcn) každopádně zatím pozorována nebyla.

4.3.2 Fragmentace DNA a počet kopií mtDNA

Pro hodnocení kvality spermií se dá vedle spermatických parametrů a mtDNAcn použít i fragmentace DNA (Derbel et al., 2021). O fragmentaci DNA se můžeme bavit jak v kontextu jaderné DNA, tak v souvislosti s mitochondriální DNA. Normozoospermie obsahuje zhruba 3× nižší množství mtDNAcn než patologické formy. S poklesem mtDNAcn můžeme pozorovat zvýšení fragmentace mtDNA. Zdá se, že u kvalitních spermií tedy nalézáme nižší množství mtDNAcn a zároveň vyšší fragmentaci mtDNA. Mohlo by jít o doklad toho, že u gamet proběhla efektivní degradace mtDNA. Buňky s nízkou fragmentací mtDNA a vysokou mtDNAcn tak pravděpodobně neprošly správným procesem spermatogeneze a tyto parametry by pro nás mohly být indikátorem zhoršené kvality spermatu (Tímermans et al., 2023).

4.4 Počet kopií mtDNA v raných fázích vývoje embrya

V raných fázích vývoje embrya nedochází k dělení mitochondrií a s postupným dělením buněk klesá počet mitochondrií na buňku. K obnově dělení mitochondrií dochází ve stádiu blastocysty v momentě, kdy se jednotlivé buňky začínají diferencovat. Vzhledem k tomu, že nedochází k dělení všech buněk zároveň, mohou mít jednotlivé buňky jedné blastocysty různé množství mitochondrií a mtDNA (Victor et al., 2019). Při odběru buněk a jejich analýze je tedy potřeba myslet na to, že jedna buňka nemusí reprezentovat celou blastocystu. Zajímavé je, že v počátečních fázích vývoje nedochází k selekci proti mutacím v mtDNA, mutace mitochondriální DNA v této fázi totiž neovlivňují vývoj a embryo s mutantní mtDNA

tak nezaniká okamžitě po oplození (Chatzovoulou et al., 2021). Během relativního poklesu mitochondrií dochází ke druhému efektu „hrdla lahve“ (Mertens et al., 2022), který byl podrobně popsán v kapitole 3.3.

Podobně jako u vajíček, není zcela jasné, jak velkou roli má počet mitochondrií v raných fázích vývoje embrya a řada studií se svými výsledky navzájem liší. Zda počet mtDNA je nebo není prediktivní parametr pro následný vývoj je podstatné hlavně z důvodu výběru nejvhodnějšího embrya při asistované reprodukci. Ostatně, jako u množství dalších parametrů, i zde je snaha zjistit, zda by počet mtDNA v mitochondriích mohl být použit jako vhodný biomarker.

Při výzkumu se používají nejčastěji 5denní a 6denní blastocysty. 6denní blastocysty obsahují nižší relativní množství mtDNA, což vzhledem k faktu, že se mtDNA během počátečních fází vývoje nedělí, není až tolik překvapivé (Scott et al., 2020). U embryí je možné měřit jak hladinu mtDNA v embryu, tak hladinu cf-mtDNA v médiu. V průběhu vývoje se do média uvolňuje postupně více volné mtDNA a u starších blastocyst tak pozorujeme více cf-mtDNA v médiu (Kobayashi et al., 2020). Čím starší je tedy embryo, tím méně mtDNA v jednotlivých buňkách obsahuje a tím více cf-mtDNA je přítomno v kultivačním médiu.

4.4.1 Kinetika počtu mtDNA po oplození

Krátce po oplození, než dojde k rozdělení buněk, nedochází u mladých myší ani k poklesu, ani k nárůstu množství mtDNA (May-Panloup et al., 2019). V této fázi je pravděpodobně vyrovnaná degradace a syntéza mtDNA a její množství tak zůstává konstantní. U starých myší ale už v této fázi můžeme pozorovat pokles počtu kopií mitochondriální DNA, což by mohlo poukazovat na nerovnováhu mezi degradací a syntézou s převahou degradace. Od doby, kdy se buňka poprvé rozdělí až do stádia osmi buněk, dochází k poklesu mtDNA_{cn} na buňku. Tento proces můžeme vysvětlit jednak efektem „hrdla lahve“ a jednak degradací paternálních mitochondrií, které se dostaly do vajíčka během oplození (May-Panloup et al., 2005). U starých myší nicméně tato fáze prakticky chybí, nedochází k postupnému poklesu mtDNA_{cn} až do stádia 8 buněk, ale nejnižší množství mtDNA obsahuje dvoubuněčné embryo. Po poklesu nastává fáze expanze a množství mtDNA opět roste. Díky absenci fáze poklesu u starých myší může dojít k předčasnému nastartování dělení mitochondrií a expanzi mtDNA dříve, než by tomu mělo být. To může rozhodit energetický metabolismus celého embrya a zároveň vést k ustavení špatné hladiny mitochondrií. Jak se tedy zdá, mtDNA kinetika hraje podstatnou roli v procesu stárnutí a jelikož myší modely jsou velmi podobné naší fyziologii, lze předpokládat, že podobný proces bude možné pozorovat během stárnutí i u člověka.

4.4.2 Schopnost implantace blastocysty

I přes fakt, že mtDNAcn oocyty nemusí mít přímý vliv na oplození, množství mitochondriální DNA přítomné v blastocystě se může odrazit na schopnosti implantace embrya (Ravichandran et al., 2017). Zvýšení počtu kopií mtDNA má pravděpodobně negativní vliv na schopnost implantace a životaschopnost embrya (Ye et al., 2020). K nárůstu množství mtDNA vede i zvýšená míra energetického stresu, v reakci na nedostatek energie produkované buňkou (Diez-Juan et al., 2015). Můžeme zde vidět propojení již dříve zmíněného. mtDNA s přítomnými delekcemi má horší schopnost tvorby ATP. V reakci na to kompenzačním mechanismem dojde ke zvýšení mtDNAcn, k opravě mtDNA ale nedojde a díky tomu má blastocysta problém s implantací a následným vývojem. Embryo se tedy přestává vyvíjet a následně zaniká.

V částečném rozporu s právě zmíněným tvrzením je nález zvýšeného množství mtDNAcn v buňkách granulózy u oocytů, z nichž vznikla embrya, která se úspěšně implantovala. Je tedy možné, že kvalitní oocyt obsahuje ve svých granulárních buňkách více mtDNA, zatímco u embrya je tomu naopak a zvýšená mtDNAcn naopak svědčí o jeho horší kvalitě (Taugourdeau et al., 2019). I zde ale můžeme nalézt naprosto opačné tvrzení, jak dokazuje řada studií, které nepozorovaly žádnou souvislost mezi mtDNAcn v kumulárních buňkách a schopností implantace (Martínez-Moro et al., 2022). Existují i důkazy o zdárné implantaci a úspěšném vývoji embryí s výrazně zvýšeným množstvím mtDNA (Victor et al., 2019). Zároveň je ale často zmiňovaná asociace mezi zvýšením mtDNAcn a aneuploidii embrya (De Munck et al., 2019).

4.5 Využití kvantifikace mtDNA v diagnostice

mtDNAcn se zdá být poměrně slibnou molekulou, která by mohla být využívána v diagnostice infertility a v metodách asistované reprodukce. Počet molekul mtDNA lze použít při vyhodnocování schopnosti implantace embrya při IVF, určování rizika preeklampsie u těhotných, hodnocení kvality spermatu a vajíček a dalším testování. Ne ve všech případech je ale zatím role mtDNAcn natolik jasná, aby bylo možné tuto molekulu použít při diagnostice. V mnohých případech jde pouze o potenciální možnost použití, nicméně často se jednotlivé studie svými výsledky vyvrací, a ačkoliv podle jedné by se mtDNAcn zdála být vhodným biomarkerem, jiný výzkum tuto alternativu zavrhuje.

Ve spermatogenezi je mtDNAcn rovněž velmi podstatným parametrem. U spermatu se běžně hodnotí tzv. spermatické parametry, které ale nemusí být nejvhodnější volbou. Vhodný biomarker by totiž měl být v čase neměnný a neměl by být ovlivněn vlivy jako věk, BMI apod., což o spermatických parametrech neplatí. mtDNAcn naproti tomu tyto parametry splňuje a je prokazatelně spojena s úspěšností fertilizace (Rosati et al., 2020).

S oocytem jsou funkčně spojeny buňky granulózy, které by mohly být využity při diagnostice schopnosti implantace embrya, aniž by byl porušen oocyt. Vyšší mtDNAcn v buňkách

granulózy je přítomna u oocytů, ze kterých se vyvinulo zdárně se implantující embryo. Pokud by tomu tak skutečně bylo, vyšší mtDNAcn u buněk granulózy by mohla poukazovat na lepší implantační potenciál embrya (Taugourdeau et al., 2019).

V průběhu těhotenství hrozí zhruba u 2-5 % těhotných rozvoj stavu zvaného preeklampsie, která představuje riziko jak pro dítě, tak pro matku. V průběhu těhotenství je možné stanovit riziko, že se preeklampsie rozvine, a je možné nasadit vhodnou terapii. V případě, že se začnou objevovat symptomy preeklampsie, je tento stav již nevratný a ve většině případů je nutné těhotenství ukončit předčasným porodem. Je proto velmi podstatné umět rozpoznat pacientky, u kterých je vysoká pravděpodobnost rozvoje preeklampsie, v čemž by mohla pomoci právě mtDNA. O preeklampsii a její souvislosti s mtDNA bude více pojednáno v kapitole 5.3.

Pro testování embryí by mohlo být využito spíše než mtDNAcn poměru mtDNA/gDNA. Embrya s dobrou kvalitou mají vyšší poměr mtDNA/gDNA, než embrya nekvalitní, a tento parametr by mohl posloužit v IVF při výběru nejvhodnějšího embrya pro transfer. Poměr mtDNA/gDNA je měřen v kumulárních buňkách a s věkem se postupně snižuje, což vede ke zhoršení kvality embrya. S rostoucím věkem rovněž ubývá mtDNAcn, na základě čehož se i mění poměr mezi mtDNA a gDNA (Yang et al., 2021).

Spojitosť mezi mtDNAcn a celkovým výsledkem těhotenství nebyla prokázána, bylo ale pozorováno zvýšení počtu kopií mtDNA za přítomnosti aneuploidie. Aneuploidní embrya prokazatelně obsahují více mtDNAcn než embrya euploidní. Otázkou zůstává, nakolik je tato informace využitelná v praxi (Podolak et al., 2022).

mtDNA nemusí být měřena pouze v pohlavních buňkách nebo embryu, ale lze ji kvantifikovat i v krvi. V periferní krvi žen s problémy s fertilitou byla nalezena nižší hladina mtDNAcn, což by mohlo odrážet nižší počet mtDNA v oocytech. Tato možnost diagnostiky by byla velmi výhodná, jelikož jde o méně invazivní vyšetření než odběr oocytů samotných (Busnelli et al., 2018).

Naprostě neinvazivním a potenciálně vhodným vyšetřením embryí před transferem v asistované reprodukci je odebrání média, ve kterém probíhá kultivace, a stanovení množství přítomné volné DNA. Zvýšení cf-mtDNA v médiu může být spojované s horší kvalitou blastocysty a taková embrya mají vyšší pravděpodobnost zániku (Kobayashi et al., 2020). Podle Sayed et al. (2021) je tomu ale přesně naopak a méně kvalitní embrya mají v médiu nižší množství cf-mtDNA, jelikož většinu používají na vlastní vývoj.

5 Volná mitochondriální DNA – cf-mtDNA

Jako o volné DNA mluvíme o jakékoliv molekule DNA, která je přítomná mimo buňku. Pojem „volná DNA“, neboli cf-DNA, zahrnuje jak volnou DNA jadernou (cf-nDNA), tak volnou DNA mitochondriální. Jelikož se tato práce zaměřuje na mitochondrie a mitochondriální DNA, bude zde rozebrána převážně cf-mtDNA.

V průběhu fyziologického těhotenství v maternální krvi spolu s rostoucí placentou stoupá koncentrace cf-mtDNA a do původních hodnot se vrací přibližně dva měsíce po porodu. Kromě velikosti placenty a stáří plodu závisí množství volné mtDNA i na pohlaví plodu (Cushen et al., 2020). U žen, které čekaly plod ženského pohlaví, byla nalezena vyšší hladina cf-mtDNA a v těchto případech se i častěji rozvinula preeklampsie (Marschalek et al., 2018).

5.1 Volná DNA v kultivačním médiu při IVF

Mitochondrie se v buňkách vyskytují v mnoha kopiích, na rozdíl od jádra, které je přítomno pouze jedno. To odráží i skutečnost, že každá buňka obsahuje výrazně vyšší množství kopií mtDNA než nDNA. Množství cf-mtDNA uvolněné z buněk blastocysty do kultivačního média roste s věkem a u starších žen vidíme vyšší množství jejích kopií. Zvýšené množství cf-mtDNA v médiu se vyskytuje u méně kvalitních embryí a často končí kolapsem vyvíjející blastocysty. Není zcela jasné, odkud přesně se cf-mtDNA do kultivačního média uvolňuje, nejspíše ale pochází z mrtvých či fragmentovaných blastomer nebo je aktivně secernována blastocystou (Kobayashi et al., 2020).

K analýze rozdílů mezi starými a mladými samicemi bylo využito kravských embryí. Při kultivaci embryí od mladých i starých krav na médiu bylo nalezeno srovnatelné množství cf-mtDNA. Poté byla odstraněna zona pellucida, která pravděpodobně blokovala průnik volné mtDNA do média, a ve skupině embryí od starých krav bylo nalezeno vyšší množství cf-mtDNA (Aoki et al., 2021). Tímto pokusem byla prokázána souvislost množství cf-mtDNA v médiu s věkem.

5.2 cf-mtDNA ve folikulární tekutině

Folikulární tekutina obklopuje oocyt a spolu se zralým vajíčkem se uvolňuje z vaječníku při ovulaci. Zdá se, že právě folikulární tekutina by mohla být klíčem k hodnocení kvality oocytů ještě před jejich oplozením. Při asistované reprodukci se ženě odebírají vajíčka i s folikulární tekutinou a v laboratorních podmínkách je odebraný oocyt následně oplozen spermii. Nevýhodou zůstává, že je poměrně problematické posoudit kvalitu oocytu před oplozením. V dnešní době se na hodnocení kvality používá převážně posouzení morfologie vajíčka, jak už ale víme, morfologicky normální vajíčko ještě nemusí být geneticky v pořádku. Mnoho genetických modifikací se tak na morfologii oocytu neprojeví a kvalitu vzniklého embrya je nutné posuzovat až v několikabuněčném stádiu blastocysty. Pokud bychom chtěli otestovat

oocyt ještě před oplozením, nabízí se nám možnosti testování granulárních buněk nebo právě folikulární tekutiny.

Ve folikulární tekutině se vyskytuje volná DNA vzniklá různými buněčnými procesy, největší procento ale pochází z apoptózy. Zatímco cf-nDNA ve folikulární tekutině poukazuje na apoptózu granulárních buněk, množství cf-mtDNA odráží změny v jejich mitochondriální funkci. cf-mtDNA tedy vzniká jiným procesem než cf-nDNA a můžeme říct, že cf-mtDNA nesouvisí s apoptózou granulárních buněk (Ichikawa et al., 2020). Komplex oocytu a kumulárních buněk s mitochondriální dysfunkcí vypouští do média větší množství cf-mtDNA. Byla nalezena i souvislost množství volné mtDNA ve folikulární tekutině s věkem ženy. U starších žen se vyskytuje vyšší množství cf-mtDNA ve folikulární tekutině a její obsah v oocytu a kumulárních buňkách klesá. V oocytech, které se vyvíjely v blastocystu, bylo nalezeno nižší množství cf-mtDNA a v jejich folikulární tekutině bylo naopak množství vyšší. cf-mtDNA ve folikulární tekutině by tak mohla být použita jako biomarker pro hodnocení kvality oocytu (Liu et al., 2019).

U myších modelů byla pozorována apoptóza granulárních buněk v souvislosti s přítomnou cf-mtDNA. Apoptóza je indukovaná vazbou cf-mtDNA na TLR9 buněk granulózy. Po přidání cf-mtDNA do média k oocytům mladých myší nedošlo k žádné změně ve vývoji blastocyst, u starých myší byla pozorována negativní korelace s vývojem blastocysty. Zdá se, že cf-mtDNA je zodpovědná za destrukci granulárních buněk procesem apoptózy (Liu et al., 2020). Nárůst volné mtDNA ve folikulární tekutině tedy indukuje apoptózu granulárních buněk a snižuje pravděpodobnost vzniku blastocysty (Kansaku et al., 2018).

5.3 Preeklampsie

Preeklampsie (PE) je jedno z velkých témat v gynekologii a porodnictví. Jde o stav, který se vyskytne až u 5 % těhotných, a který se může vyvinout až do život ohrožujícího záchvatu eklampsie. Toto onemocnění se začíná projevovat po 20. týdnu těhotenství. V dnešní době jsme schopni pouze určit riziko rozvoje preeklampsie v průběhu těhotenství, diagnostika má ale stále své nedostatky. V případě zvýšeného rizika je ženě nasazena vhodná léčba, která by měla příznaky preeklampsie co nejvíce oddálit a zamezit rozvoji eklampsie. I přes nasazení medikace se preeklampsie může rozvinout a je jedním z velmi častých příčin předčasného porodu.

Důvodem preeklampsie je špatná funkce placenty a mezi její základní projevy patří nárůst krevního tlaku matky, který může poškozovat její orgány včetně mozku. V případě neléčené preeklampsie dochází ke vzniku záchvatu eklampsie, jehož jediným řešením je okamžité ukončení těhotenství bez ohledu na stáří plodu. Nejen, že preeklampsie vede k předčasnému porodu, ale díky nedostatečné funkci placenty má dítě často nedostatek živin a takto narozené děti mají vyšší pravděpodobnost intrauterinní růstové retardace. Zároveň jsou tyto děti často malé ke gestačnímu věku, což může vést k dalším komplikacím po narození. Každý

den navíc v děloze je pro dítě velmi podstatný a v případě nasazení léků v počátcích těhotenství se tak může porod značně oddálit, což je pro vývoj dítěte zásadní. V posledních letech se v diagnostice preeklampsie mluví o použití mtDNA.

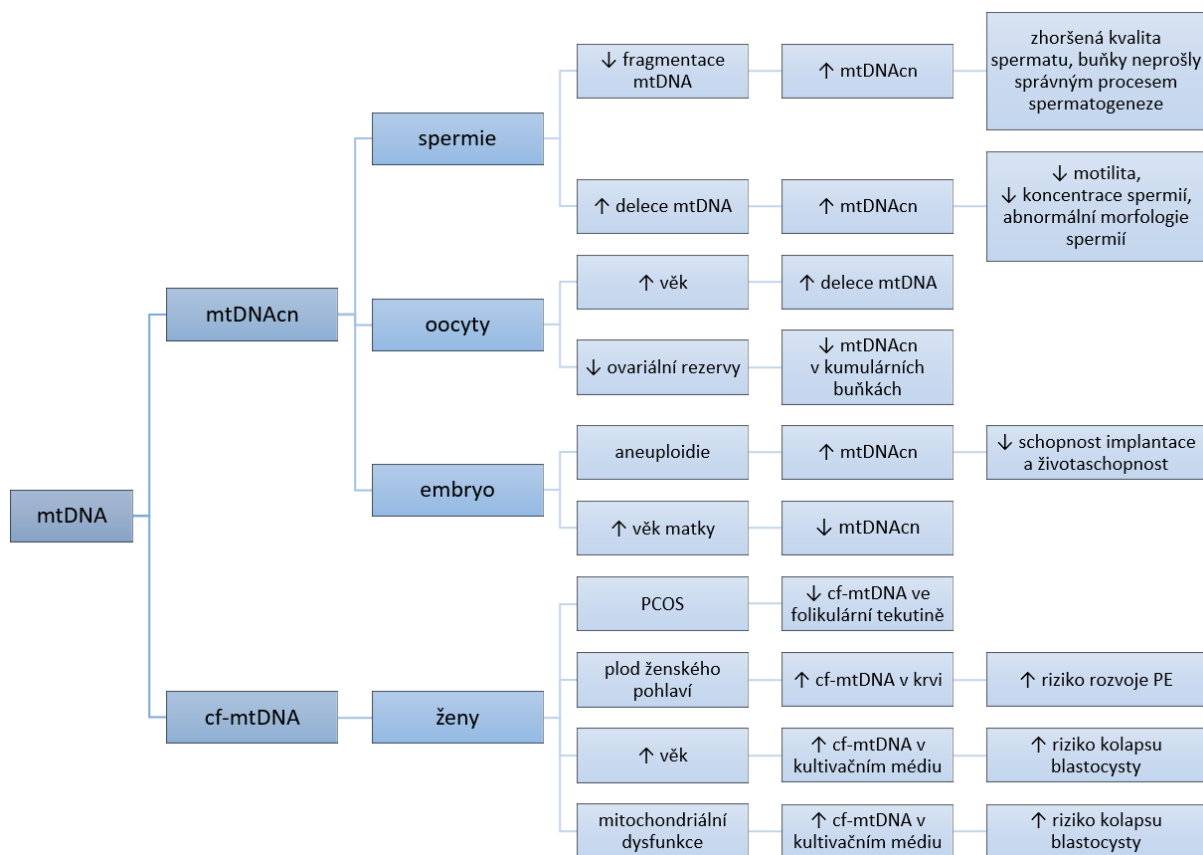
U žen s prokázanou mitochondriální dysfunkcí bylo zaznamenáno zvýšené riziko rozvoje preeklampsie. Při porovnání žen s preeklampsií a bez ní bylo nalezeno zvýšené množství mtDNA v séru PE pacientek. U žen, jejichž děti vykazovaly intrauterinní růstovou retardaci, bylo rovněž v séru nalezeno zvýšené množství mtDNA (Colleoni et al., 2010). V placentě pacientek s preeklampsií můžeme nalézt snížené množství mtDNA a naopak zvýšenou mitofágií a autofágií (Vangrieken et al., 2021). Zvýšená mitofágií v PE placentách je důsledkem chronické hypoxie (Gillmore et al., 2022).

Navzdory předchozímu tvrzení, Cushen et al. (2022) našli u žen s preeklampsií naopak sníženou hladinu cirkulující volné mtDNA v plazmě, mtDNA_{cn} v krevních buňkách se ale od zdravých žen nijak nelišila. cf-mtDNA se v plazmě vyskytovala převážně obalená ve vezikulách. Snížená cf-mtDNA byla nalezena už v prvním trimestru u žen, u kterých se následně preeklampsie rozvinula (Busnelli et al., 2019). Pokud by tedy byla prokázaná asociace mezi snížením cf-mtDNA a následným rozvinutím PE, bylo by možné pomocí cirkulující volné mtDNA vyselektovat ženy se zvýšeným rizikem vzniku onemocnění.

V rozvoji preeklampsie má klíčovou roli mitochondriální dysfunkce. Při mitochondriální dysfunkci dochází ke zvýšení oxidačního stresu, který je výsledkem nerovnováhy mezi reaktivními formami kyslíku a antioxidačními mechanismy. Oxidační stres vede ke zvýšení syntézy mtDNA ve snaze zabránit vzniku ROS. Aby nedošlo k poškození DNA reaktivními formami kyslíku, je v buňkách přítomný antioxidant superoxid dismutáza (SOD). Koncentrace SOD v průběhu fyziologického těhotenství narůstá a tvoří tak bariéru proti působení ROS. U pacientek s preeklampsií byl nicméně nalezen opačný fenomén a koncentrace SOD v průběhu těhotenství klesala, zatímco koncentrace mtDNA vzrůstala (Williamson et al., 2018).

6 Souhrn

Změny v mtDNA, ať už způsobené patologickými procesy nebo fyziologickým stárnutím buněk, se podílí na plodnosti a mají vliv na celý proces vývoje nového jedince od vzniku gamet až po samotný porod. Z hlediska diagnostiky jsou podstatné především změny v množství mtDNA v buňkách či volné mtDNA v krevní plazmě nebo kultivačním médiu.



Obr. 1. Schéma shnující aktuální poznatky o mtDNA.

7 Závěr

K plnému pochopení významu mtDNA v reprodukci je ještě dlouhá cesta, už teď ale můžeme říct, že má před sebou slibnou budoucnost. Za problém současných výsledků se dá označit to, že mnoho studií jde svými výsledky proti sobě a neshodují se na jednotném závěru. Často je proto obtížné odhalit skutečnost a posoudit, které tvrzení opravdu odráží reálnou situaci v buňce.

V tuto chvíli je nejprozkoumanější oblastí mitochondriální DNA počet jejích kopií, který má odlišnou dynamiku v různých buňkách. Oocyty, spermie i embryo se tedy pravděpodobně s chybami v mtDNA vypořádávají jinými mechanismy.

Volná mtDNA v krvi matky může být v budoucnosti hojně využívána především ve stanovení rizika rozvoje preeklampsie a pro výběr vhodného embrya k implantaci. Použití cf-mtDNA by mohlo pomoci odhalit riziková těhotenství a zabránit tak vzniku komplikací jak na straně matky, tak na straně plodu. cf-mtDNA v kulturačním médiu dává informaci o mechanismu, kterým se embryo zbavuje chybné mtDNA.

Potenciál mtDNA je i v jejím využití jakožto biomarkeru a to nejen ve fyziologickém těhotenství, ale především v rámci asistované reprodukce. Zde by mohla být využita při hodnocení kvality pohlavních buněk a výběru nejvhodnějšího embrya k transferu, což jsou zásadní kroky, jež mohou značně ovlivnit úspěšnost implantace a donošení zdravého plodu.

Hromadění mutací v mtDNA a změny v mtDNA_{cn} s rostoucím věkem jsou jedním z důvodů poklesu plodnosti a nárůstu komplikací spojených s otěhotněním a donošením zdravého plodu. Vedle věku se na plodnosti a poruchách s ní spojenými podílí i životní styl nebo prostředí, ve kterém žijeme. Pokud bude odhalen mechanismus, který vede ke zhoršení buněčných funkcí, bude možné částečně toto poškození kompenzovat a vznikající komplikace zmírnit.

8 Seznam použité literatury

* Označení sekundární citace

- Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., & Ramalho-Santos, J. (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. In *Reproduction* (Vol. 146, Issue 5).
<https://doi.org/10.1530/REP-13-0178>
- Andreu, A. L., Martinez, R., Marti, R., & García-Arumí, E. (2009). Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion*, 9(4).
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.02.006>
- Aoki, S., Ito, J., Hara, S., Shirasuna, K., & Iwata, H. (2021). Effect of maternal aging and vitrification on mitochondrial DNA copy number in embryos and spent culture medium. *Reproductive Biology*, 21(2). <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100506>
- Babayev, E., Wang, T., Szigeti-Buck, K., Lowther, K., Taylor, H. S., Horvath, T., & Seli, E. (2016). Reproductive aging is associated with changes in oocyte mitochondrial dynamics, function, and mtDNA quantity. *Maturitas*, 93.
<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.06.015>
- Boucret, L., Chao De La Barca, J. M., Morinière, C., Desquiret, V., Ferré-L'Hôtelier, V., Descamps, P., Marcaillou, C., Reynier, P., Procaccio, V., & May-Panloup, P. (2015). Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Human Reproduction*, 30(7). <https://doi.org/10.1093/humrep/dev114>
- Bowolaksono, A., Sundari, A. M., Fauzi, M., Maidarti, M., Wiweko, B., Mutia, K., Iffanolida, P. A., Febri, R. R., Dwiranti, A., & Funahashi, H. (2022). Anti-Müllerian hormone independently affect mtDNA copy number in human granulosa cells. *Journal of Ovarian Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01047-4>
- Busnelli, A., Lattuada, D., Ferrari, S., Reschini, M., Colciaghi, B., Somigliana, E., Fedele, L., & Ferrazzi, E. (2019). Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood in the First Trimester of Pregnancy and Different Preeclampsia Clinical Phenotypes Development: A Pilot Study. *Reproductive Sciences*, 26(8). <https://doi.org/10.1177/1933719118804410>
- Busnelli, A., Lattuada, D., Rossetti, R., Paffoni, A., Persani, L., Fedele, L., & Somigliana, E. (2018). Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood: a potential non-invasive biomarker for female subfertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(11).
<https://doi.org/10.1007/s10815-018-1291-5>
- Chatzovoulou, K., Mayeur, A., Gigarel, N., Jabot-Hanin, F., Hesters, L., Munnich, A., Frydman, N., Bonnefont, J. P., & Steffann, J. (2021). Mitochondrial DNA mutations do not impact early human embryonic development. *Mitochondrion*, 58.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.02.012>

- Chiaratti, M. R., & Meirelles, F. V. (2010). Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. In *Biology of Reproduction* (Vol. 83, Issue 1).
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084269>
- *Cioppi, F., Casamonti, E., & Krausz, C. (2019). Age-dependent de novo mutations during spermatogenesis and their consequences. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1166). https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_2
- Colleoni, F., Lattuada, D., Garretto, A., Massari, M., Mand, C., Somigliana, E., & Cetin, I. (2010). Maternal blood mitochondrial DNA content during normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(4). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.05.027>
- Coticchio, G., Dal Canto, M., Renzini, M. M., Guglielmo, M. C., Brambillasca, F., Turchi, D., Novara, P. V., & Fadini, R. (2014). Oocyte maturation: Gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*, 21(4), 427–454.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011>
- Cushen, S. C., Ricci, C. A., Bradshaw, J. L., Silzer, T., Blessing, A., Sun, J., Zhou, Z., Scroggins, S. M., Santillan, M. K., Santillan, D. A., Phillips, N. R., & Goulopoulou, S. (2022). Reduced Maternal Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA Is Associated With the Development of Preeclampsia. *Journal of the American Heart Association*, 11(2).
<https://doi.org/10.1161/JAHA.121.021726>
- Cushen, S. C., Sprouse, M. L., Blessing, A., Sun, J., Jarvis, S. S., Okada, Y., Fu, Q., Romero, S. A., Phillips, N. R., & Goulopoulou, S. (2020). Cell-free mitochondrial DNA increases in maternal circulation during healthy pregnancy: A prospective, longitudinal study. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 318(2). <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00324.2019>
- De Munck, N., Liñán, A., Elkhatib, 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).
<https://doi.org/10.1007/s10815-019-01544-4>
- Derbel, R., Sellami, H., Sakka, R., Ben Slima, A., Mkaddem, I., Gdoura, R., Mcelreavey, E., & Ammar-Keskes, L. (2021). Relationship between nuclear DNA fragmentation, mitochondrial DNA damage and standard sperm parameters in spermatozoa of infertile patients with leukocytospermia. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 50(5). <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2021.102101>
- 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).
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.05.022>
- Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., De Jong, F. H., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. N. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142(11). <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8486>
- Freeman, E. W., Sammel, M. D., Lin, H., & Gracia, C. R. (2012). Anti-Mullerian hormone as a predictor of time to menopause in late reproductive age women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(5). <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3032>
- Gibson, T. C., Pei, Y., Quebedeaux, T. M., & Brenner, C. A. (2006). Mitochondrial DNA deletions in primate embryonic and adult stem cells. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(1), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60987-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60987-X)
- Gillmore, T., Farrell, A., Alahari, S., Sallais, J., Kurt, M., Park, C., Ausman, J., Litvack, M., Post, M., & Caniggia, I. (2022). Dichotomy in hypoxia-induced mitochondrial fission in placental mesenchymal cells during development and preeclampsia: consequences for trophoblast mitochondrial homeostasis. *Cell Death and Disease*, 13(2).
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-04641-y>
- Gyllenstein, U., Wharton, D., Josefsson, A., & Wilson, A. C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352(6332), 255–257.
<https://doi.org/10.1038/352255a0>
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., & Keightley, P. D. (2008). Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060204>
- Hammond, E. R., Green, M. P., Shelling, A. N., Berg, M. C., Peek, J. C., & Cree, L. M. (2016). Oocyte mitochondrial deletions and heteroplasmy in a bovine model of ageing and ovarian stimulation. *Molecular Human Reproduction*, 22(4).
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaw003>
- Hehenkamp, W. J. K., Looman, C. W. N., Themmen, A. P. N., De Jong, F. H., Te Velde, E. R., & Broekmans, F. J. M. (2006). Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(10). <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0331>
- Ichikawa, K., Shibahara, H., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2020). Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1002/rmb2.12309>

- Ieremiadou, F., & Rodakis, G. C. (2009). Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Research Notes*, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-18>
- Jansen, R. P. S., & De Boer, K. (1998). The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00173-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00173-7)
- Jiang, M., Kauppila, T. E. S., Motori, E., Li, X., Atanassov, I., Folz-Donahue, K., Bonekamp, N. A., Albarran-Gutierrez, S., Stewart, J. B., & Larsson, N. G. (2017). Increased Total mtDNA Copy Number Cures Male Infertility Despite Unaltered mtDNA Mutation Load. *Cell Metabolism*, 26(2), 429-436.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.003>
- Jing, Y., Li, L., Li, Y. Y., Ouyang, Y. C., Sun, Q. Y., Zhang, C. L., & Li, R. (2019). Embryo quality, and not chromosome nondiploidy, affects mitochondrial DNA content in mouse blastocysts. *Journal of Cellular Physiology*, 234(7). <https://doi.org/10.1002/jcp.27713>
- Kansaku, K., Munakata, Y., Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2018). Mitochondrial dysfunction in cumulus-oocyte complexes increases cell-free mitochondrial DNA. *Journal of Reproduction and Development*, 64(3). <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-012>
- Keefe, D. L., Niven-Fairchild, T., Powell, S., & Buradagunta, S. (1995). Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertility and Sterility*, 64(3). [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)57796-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)57796-6)
- Kobayashi, M., Kobayashi, J., Shirasuna, K., & Iwata, H. (2020). Abundance of cell-free mitochondrial DNA in spent culture medium associated with morphokinetics and blastocyst collapse of expanded blastocysts. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(4). <https://doi.org/10.1002/rmb2.12344>
- Konstantinidis, M., Alfarawati, S., Hurd, D., Paolucci, M., Shovelton, J., Fragouli, E., & Wells, D. (2014). Simultaneous assessment of aneuploidy, polymorphisms, and mitochondrial DNA content in human polar bodies and embryos with the use of a novel microarray platform. *Fertility and Sterility*, 102(5). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.1233>
- Li, X. H., Chai, R. R., Chen, G. W., Zhang, L. F., Tan-Tai, W. J., Shi, H. J., Martin-Deleon, P., O, W. S., & Chen, H. (2020). Prohibitin (PHB) interacts with AKT in mitochondria to coordinately modulate sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, 22(6), 583–589. https://doi.org/10.4103/aja.aja_46_20
- Lim, Y., Rubio-Peña, K., Sobraske, P. J., Molina, P. A., Brookes, P. S., Galy, V., & Nehrke, K. (2019). Fndc-1 contributes to paternal mitochondria elimination in *C. elegans*. *Developmental Biology*, 454(1). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.016>

- Liu, Y., Shen, Q., Li, H., Xiang, W., & Zhang, L. (2020). Cell-free mitochondrial DNA increases granulosa cell apoptosis and reduces aged oocyte blastocyst development in the mouse. *Reproductive Toxicology*, *98*. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.10.012>
- Liu, Y., Shen, Q., Zhao, X., Zou, M., Shao, S., Li, J., Ren, X., & Zhang, L. (2019). Cell-free mitochondrial DNA in human follicular fluid: A promising bio-marker of blastocyst developmental potential in women undergoing assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0495-6>
- Lukaszuk, K., & Podolak, A. (2022). Does Trophectoderm Mitochondrial DNA Content Affect Embryo Developmental and Implantation Potential? *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23115976>
- Luo, S. M., Ge, Z. J., Wang, Z. W., Jiang, Z. Z., Wang, Z. B., Ouyang, Y. C., Hou, Y., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2013). Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.1303231110>
- 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). <https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>
- Ma, H., Hayama, T., Van Dyken, C., Darby, H., Koski, A., Lee, Y., Gutierrez, N. M., Yamada, S., Li, Y., Andrews, M., Ahmed, R., Liang, D., Gonmanee, T., Kang, E., Nasser, M., Kempton, B., Brigande, J., McGill, T. J., Terzic, A., ... Mitalipov, S. (2020). Deleterious mtDNA mutations are common in mature oocytes. *Biology of Reproduction*, *102*(3). <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz202>
- Mahrous, E., Yang, Q., & Clarke, H. J. (2012). Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction*, *144*(2). <https://doi.org/10.1530/REP-12-0113>
- Marschalek, J., Wohlrab, P., Ott, J., Wojta, J., Speidl, W., Klein, K. U., Kiss, H., Pateisky, P., Zeisler, H., & Kuessel, L. (2018). Maternal serum mitochondrial DNA (mtDNA) levels are elevated in preeclampsia – A matched case-control study. *Pregnancy Hypertension*, *14*. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.10.003>
- Martínez-Moro, Á., Lamas-Toranzo, I., González-Brusi, L., Pérez-Gómez, A., Padilla-Ruiz, E., García-Blanco, J., & Bermejo-Álvarez, P. (2022). mtDNA content in cumulus cells does not predict development to blastocyst or implantation. *Human Reproduction Open*, *2022*(3). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac029>

- May-Panloup, P., Brochard, V., Hamel, J. F., Desquirit-Dumas, V., Chupin, S., Reynier, P., & Duranthon, V. (2019). Maternal ageing impairs mitochondrial DNA kinetics during early embryogenesis in mice. *Human Reproduction*, *34*(7).
<https://doi.org/10.1093/humrep/dez054>
- May-Panloup, P., Vignon, X., Chrétien, M. F., Heyman, Y., Tamassia, M., Mathièry, 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*, *3*.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-65>
- 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). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac059>
- Orszynowicz, M., Pawlak, P., Podstawski, Z., Nizanski, W., Partyka, A., Gotowiecka, M., Kosiniak-Kamysz, K., & Lechniak, D. (2016). Mitochondrial DNA Copy Number in Spermatozoa of Fertile Stallions. *Reproduction in Domestic Animals*, *51*(3).
<https://doi.org/10.1111/rda.12689>
- Podolak, A., Liss, J., Kiewisz, J., Pukszta, S., Cybulska, C., Rychlowski, M., Lukaszuk, A., Jakiel, G., & Lukaszuk, K. (2022). Mitochondrial DNA Copy Number in Cleavage Stage Human Embryos—Impact on Infertility Outcome. *Current Issues in Molecular Biology*, *44*(1).
<https://doi.org/10.3390/cimb44010020>
- Qasemi, M., Aleyasin, A., Mahdian, R., Ghanami Gashti, N., Shabani Nashtaei, M., Ashrafnezhad, Z., & Amidi, F. (2021). Cell-free mtDNA level and its biomarker potency for ART outcome are different in follicular fluid of PCOS and non-PCOS women. *Mitochondrion*, *59*. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.04.003>
- Ravichandran, K., McCaffrey, C., Grifo, J., Morales, A., Perloe, M., Munne, S., Wells, D., & Fragouli, E. (2017). Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: Retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers. *Human Reproduction*, *32*(6). <https://doi.org/10.1093/humrep/dex070>
- Ritu, G., Veerasigamani, G., Ashraf, M., Singh, S., Laheri, S., Colaco, S., & Modi, D. (2022). Mitochondrial DNA levels in trophectodermal cells show no association with blastocyst development and pregnancy outcomes. *Journal of Human Reproductive Sciences*, *15*(1).
https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_103_21

- Rosati, A. J., Whitcomb, B. W., Brandon, N., Buck Louis, G. M., Mumford, S. L., Schisterman, E. F., & Pilsner, J. R. (2020). Sperm mitochondrial DNA biomarkers and couple fecundity. *Human Reproduction*, *35*(11). <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa191>
- Saleh Jaweesh, M., Hammadeh, M. E., Dahadhah, F. W., Al Zoubi, M. S., & Amor, H. (2022). Association between the single nucleotide variants of the mitochondrial cytochrome B gene (MT-CYB) and the male infertility. *Molecular Biology Reports*, *49*(5). <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07200-y>
- Santos, C., Sierra, B., Álvarez, L., Ramos, A., Fernández, E., Nogués, R., & Aluja, M. P. (2008). Frequency and pattern of heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, *67*(2). <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9138-9>
- Santos, T. A., El Shourbagy, S., & St. John, J. C. (2006). Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and Sterility*, *85*(3). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.09.017>
- *Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1833, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>
- Sayed, G. A., Al-Sawaf, H. A., Al-Sawaf, A. H., Saeid, M., Maged, A., & Ibrahim, I. H. (2021). Mitochondrial DNA in fresh versus frozen embryo culture media of polycystic ovarian syndrome patients undergoing invitro fertilization: A possible predictive marker of a successful pregnancy. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, *14*. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S284064>
- Scott, R. T., Sun, L., Zhan, Y., Marin, D., Tao, X., & Seli, E. (2020). Mitochondrial DNA content is not predictive of reproductive competence in euploid blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online*, *41*(2). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.011>
- Sherry, S. T., Rogers, A. R., Harpending, H., Soodyall, H., Jenkins, T., & Stoneking, M. (1994). Mismatch distributions of mtDNA reveal recent human population expansions. *Human Biology*, *66*(5).
- Shukla, P., Mukherjee, S., & Patil, A. (2020). Identification of variants in mitochondrial D-Loop and OriL region and analysis of mitochondrial DNA copy number in women with polycystic ovary syndrome. *DNA and Cell Biology*, *39*(8). <https://doi.org/10.1089/dna.2019.5323>
- St. John, J. C. (2002). Ooplasm donation in humans: The need to investigate the transmission of mitochondrial DNA following cytoplasmic transfer. In *Human Reproduction* (Vol. 17, Issue 8). <https://doi.org/10.1093/humrep/17.8.1954>

- Stewart, J. B., Freyer, C., Elson, J. L., Wredenberg, A., Cansu, Z., Trifunovic, A., & Larsson, N. G. (2008). Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060010>
- Stigliani, S., Persico, L., Lagazio, C., Anserini, P., Venturini, P. L., & Scaruffi, P. (2014). Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Molecular Human Reproduction*, *20*(12). <https://doi.org/10.1093/molehr/gau086>
- Sun, B., Hou, J., Ye, Y. X., Chen, H. G., Duan, P., Chen, Y. J., Xiong, C. L., Wang, Y. X., & Pan, A. (2022). Sperm mitochondrial DNA copy number in relation to semen quality: A cross-sectional study of 1164 potential sperm donors. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *129*(13). <https://doi.org/10.1111/1471-0528.17139>
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, *402*(6760), 371–372. <https://doi.org/10.1038/46466>
- Taugourdeau, A., Desquirit-Dumas, V., Hamel, J. F., Chupin, S., Boucret, L., Ferré-L’Hotellier, V., Bouet, P. E., Descamps, P., Procaccio, V., Reynier, P., & May-Panloup, P. (2019). The mitochondrial DNA content of cumulus cells may help predict embryo implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *36*(2). <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1348-5>
- Tiegs, A. W., Tao, X., Landis, J., Zhan, Y., Franasiak, J. M., Seli, E., Wells, D., Fragouli, E., & Scott, R. T. (2020). Sperm Mitochondrial DNA Copy Number Is Not a Predictor of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Cycle Outcomes. *Reproductive Sciences*, *27*(6). <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00163-0>
- Tímermans, A., Otero, F., Garrido, M., Gosálvez, J., Johnston, S., & Fernández, J. L. (2023). Addendum to: The relationship between sperm nuclear DNA fragmentation, mitochondrial DNA fragmentation and copy number in normal and abnormal human ejaculates. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13559>
- Vangrieken, P., Al-Nasiry, S., Bast, A., Leermakers, P. A., Tulen, C. B. M., Schiffers, P. M. H., van Schooten, F. J., & Remels, A. H. V. (2021). Placental Mitochondrial Abnormalities in Preeclampsia. *Reproductive Sciences*, *28*(8). <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00464-y>
- Victor, A., Griffin, D., K. Gardner, D., Brake, A., Zouves, C., Barnes, F., & Viotti, M. (2019). Births from embryos with highly elevated levels of mitochondrial DNA. *Reproductive BioMedicine Online*, *39*(3). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.03.214>

- Vissing, J. (2019). Paternal comeback in mitochondrial DNA inheritance. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 116, Issue 5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1821192116>
- Vozdova, M., Kubickova, S., Kopecka, V., Sipek, J., & Rubes, J. (2022). Association between sperm mitochondrial DNA copy number and deletion rate and industrial air pollution dynamics. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12328-9>
- Wai, T., Ao, A., Zhang, X., Cyr, D., Dufort, D., & Shoubridge, E. A. (2010). The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biology of Reproduction*, *83*(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080887>
- Wai, T., Teoli, D., & Shoubridge, E. A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*, *40*(12), 1484–1488. <https://doi.org/10.1038/ng.258>
- Williamson, R. D., McCarthy, F. P., Khashan, A. S., Totorika, A., Kenny, L. C., & McCarthy, C. (2018). Exploring the role of mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension*, *13*. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.06.012>
- Wu, H., Huffman, A. M., Whitcomb, B. W., Josyula, S., Labrie, S., Tougias, E., Rahil, T., Sites, C. K., & Pilsner, J. R. (2019a). Sperm mitochondrial DNA measures and semen parameters among men undergoing fertility treatment. *Reproductive BioMedicine Online*, *38*(1). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.10.004>
- Wu, H., Whitcomb, B. W., Huffman, A., Brandon, N., Labrie, S., Tougias, E., Lynch, K., Rahil, T., Sites, C. K., & Richard Pilsner, J. (2019b). Associations of sperm mitochondrial DNA copy number and deletion rate with fertilization and embryo development in a clinical setting. *Human Reproduction*, *34*(1). <https://doi.org/10.1093/humrep/dey330>
- Yang, L., Lin, X., Tang, H., Fan, Y., Zeng, S., Jia, L., Li, Y., Shi, Y., He, S., Wang, H., Hu, Z., Gong, X., Liang, X., Yang, Y., & Liu, X. (2020). Mitochondrial DNA mutation exacerbates female reproductive aging via impairment of the NADH/NAD⁺ redox. *Aging Cell*, *19*(9). <https://doi.org/10.1111/accel.13206>
- Yang, S. C., Yu, E. J., Park, J. K., Kim, T. H., Eum, J. H., Paek, S. K., Hwang, J. Y., Lyu, S. W., Kim, J. Y., Lee, W. S., Yoon, T. K., Song, H., & Lee, H. J. (2021). The Ratio of Mitochondrial DNA to Genomic DNA Copy Number in Cumulus Cell May Serve as a Biomarker of Embryo Quality in IVF Cycles. *Reproductive Sciences*, *28*(9). <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00532-3>
- Ye, M., Hu, B., Shi, W., Guo, F., Xu, C., & Li, S. (2021). Mitochondrial DNA 4977 bp Deletion in Peripheral Blood Is Associated With Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.675581>

- Ye, M., Shi, W., Hao, Y., Zhang, L., Chen, S., Wang, L., He, X., Li, S., & Xu, C. (2020). Associations of mitochondrial DNA copy number and deletion rate with early pregnancy loss. *Mitochondrion*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.07.006>
- Zhang, J., Liu, H., Luo, S., Lu, Z., Chávez-Badiola, A., Liu, Z., Yang, M., Merhi, Z., Silber, S. J., Munné, S., Konstandinidis, M., Wells, D., & Huang, T. (2017a). Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reproductive BioMedicine Online*, 34(4). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.013>
- Zhang, R., Wang, Y., Ye, K., Picard, M., & Gu, Z. (2017b). Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4287-0>
- Zhang, T., Xi, Q., Wang, D., Li, J., Wang, M., Li, D., Zhu, L., & Jin, L. (2019). Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress involved in oocyte aging: An analysis using single-cell RNA-sequencing of mouse oocytes. *Journal of Ovarian Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0529-x>
- Zhou, Q., Li, H., Li, H., Nakagawa, A., Lin, J. L. J., Lee, E. S., Harry, B. L., Skeen-Gaar, R. R., Suehiro, Y., William, D., Mitani, S., Yuan, H. S., Kang, B. H., & Xue, D. (2016). Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science*, 353(6297). <https://doi.org/10.1126/science.aaf4777>
- Zhu, L., Li, J., Wang, M., Fang, Z., Zheng, F., Li, Z., & Jin, L. (2021). Normalized Mitochondrial DNA Copy Number Can Optimize Pregnancy Outcome Prediction in IVF. *Reproductive Sciences*, 28(5), 1439–1446. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00422-0>
- Zhu, Z., Umehara, T., Okazaki, T., Goto, M., Fujita, Y., Hoque, S. A. M., Kawai, T., Zeng, W., & Shimada, M. (2019). Gene expression and protein synthesis in mitochondria enhance the duration of high-speed linear motility in boar sperm. *Frontiers in Physiology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00252>