



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE

**lek. Tomasz Machałowski**

**OCENA INTEGRALNOŚCI GENOMU PLEMNIKÓW  
I POTENCJAŁU OKSYDACYJNO-REDUKCYJNEGO  
W NASIENIU ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM  
MĘŻCZYZN NIEPŁODNYCH**

**ASSESSMENT OF SPERM GENOMIC INTEGRITY  
AND OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL IN SEMEN  
WITH PARTICULAR CONSIDERATION OF INFERTILE MEN**

*Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
Dyscyplina nauki medyczne*

Promotor: **prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Małgorzata Piasecka**  
Promotor pomocniczy: **dr n. med. Kamil Gill**

Pracę wykonano  
w Zakładzie Histologii i Biologii Rozwoju

Szczecin, 2024



*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania  
Pani prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Małgorzacie Piaseckiej  
oraz dr n. med. Kamilowi Gillowi  
za wsparcie, merytoryczne wskazówki, cierpliwość  
oraz poświęcony czas na realizację niniejszej dysertacji*

*Pracę dedykuję Rodzinie, zwłaszcza  
wspaniałej Żonie Julicie oraz Synowi Frankowi,  
bez których wsparcia i wyrozumiałości  
nie byłoby możliwe osiągnięcie tego celu*



## SPIS TREŚCI

<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	7
<b>STRESZCZENIE</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. WPROWADZENIE</b> .....	13
1.1. Niepłodność męska .....	13
1.1.1. Definicja niepłodności. Epidemiologia .....	13
1.1.2. Wieloczynnikowa etiopatogeneza niepłodności męskiej .....	13
1.1.3. Diagnostyka niepłodności męskiej .....	14
1.2. Chromatyna dojrzałego plemnika .....	15
1.2.1. Budowa chromatyny dojrzałego plemnika .....	15
1.2.2. Etiopatogeneza uszkodzeń jądrowego DNA plemników .....	16
1.2.2.1. Zaburzenia spermiogenezy – nieprawidłowa aktywność topoizomerazy II .....	16
1.2.2.2. Apoptoza .....	17
1.2.2.3. Reaktywne formy tlenu – stres oksydacyjny. ....	18
1.3. Stres oksydacyjny w nasieniu .....	18
1.3.1. Reaktywne formy tlenu .....	19
1.3.2. Reaktywne formy azotu .....	21
1.3.3. Antyoksydanty w nasieniu .....	21
1.3.3.1. Antyoksydanty enzymatyczne .....	21
1.3.3.2. Antyoksydanty nieenzymatyczne .....	25
1.3.3.3. Prostatosomy .....	26
1.3.4. Źródła reaktywnych form tlenu w nasieniu .....	27
1.3.4.1. Endogenne źródła reaktywnych form tlenu w nasieniu .....	27
1.3.4.2. Egzogenne źródła reaktywnych form tlenu w nasieniu .....	31
1.3.5. Fizjologiczna rola RFT .....	31
1.3.6. Kliniczne konsekwencje stresu oksydacyjnego .....	34
<b>2. UZASADNIENIE I CEL BADAŃ</b> .....	37
<b>3. MATERIAŁ I METODY</b> .....	39
3.1. Pacjenci .....	39
3.2. Analiza seminologiczna, WHO, 2021 .....	39
3.3. Test dyspersji chromatyny plemnika (SCD) – rozszerzona analiza nasienia .....	40

3.4. Test weryfikujący potencjał oksydacyjno–redukcyjny w nasieniu – zaawansowana analiza nasienia .....	41
3.5. Analiza statystyczna .....	41
<b>4. WYNIKI BADAŃ</b> .....	<b>43</b>
4.1. Podstawowa analiza seminologiczna – porównanie badanych grup mężczyzn .	43
4.2. Rozszerzona analiza seminologiczna .....	43
4.2.1. Ocena integralności genomu plemników i potencjału oksydacyjno–redukcyjnego w nasieniu – porównanie badanych grup mężczyzn.....	43
4.2.2. Częstość występowania mężczyzn z SDF >20% i sORP >1,37 w badanych grupach .....	43
4.2.3. Iloraz szans na wystąpienie SDF >20% oraz sORP >1,37 w grupie mężczyzn niepłodnych w odniesieniu do grupy mężczyzn płodnych.....	43
4.3. Wartość prognostyczna testu SCD i testu weryfikującego sORP w nasieniu dla odróżnienia mężczyzn niepłodnych od płodnych – analiza krzywej ROC ..	46
<b>5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW</b> .....	<b>47</b>
<b>6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA</b> .....	<b>48</b>
6.1. Mężczyźni niepłodni mają obniżone podstawowe parametry nasienia w porównaniu do mężczyzn płodnych .....	48
6.2. Mężczyźni niepłodni mają wyższe ryzyko uszkodzenia chromatyny plemników oraz wyższe ryzyko stresu oksydacyjnego w nasieniu niż mężczyźni płodni .....	49
6.3. Wartość prognostyczna testu SCD i testu weryfikującego sORP za pomocą systemu MiOXSYS® .....	51
<b>7. WNIOSKI</b> .....	<b>54</b>
<b>8. SPIS RYCIN I TABEL</b> .....	<b>55</b>
<b>9. PIŚMIENNICTWO</b> .....	<b>56</b>
<b>10. ANEKS – NOTA BIOGRAFICZNA DOKTORANTA</b> .....	<b>65</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

4-HNE, 4-hydroksynonenal (ang. <i>4-hydroxynonenal</i> )	<i>IL4I1</i> , gen kodujący oksydazę L-aminokwasową (ang. <i>interleukin 4 induced 1</i> )
8-OHdG, 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (ang. <i>8-hydroxy-2'-deoxyguanosine</i> )	IUI, inseminacja domaciczna (ang. <i>intrauterine insemination</i> )
95% CI, 95% przedział ufności, (ang. <i>95% confidence interval</i> )	IVF, zapłodnienie <i>in vitro</i> (ang. <i>in vitro fertilization</i> )
ALC, acetylokarnityna (ang. <i>acetyl-L-carnitine</i> )	LC, L-karnityna, $\beta$ -hydroksy- $\gamma$ -trimetyloamoniomaślan (ang. <i>L-carnitine</i> )
ALOX15, 15-lipooksygenaza arachidonowa (ang. <i>arachidonate 15-lipoxygenase</i> )	LH, hormon luteinizujący (ang. <i>luteinizing hormone</i> )
AP, miejsce apurynowe (ang. <i>apurinic site</i> )	MDA, dialdehyd malonowy (ang. <i>malonodialdehyde</i> )
AUC, pole powierzchni pod krzywą (ang. <i>area under curve</i> )	mGPx4, mPHGPx, mitochondrialna forma peroksydazy glutationowej (ang. <i>mitochondrial glutathione peroxidase</i> )
AZF, czynnik ulegający delecji w azoospermii (ang. <i>azoospermia factor</i> )	MOSI, niepłodność męska związana ze stresem oksydacyjnym (ang. <i>male oxidative stress infertility</i> )
BER, system naprawy typu BER (ang. <i>base excision repair</i> )	nGPx4, nPHGPx, jądrowa forma peroksydazy glutationowej (ang. <i>nuclear glutathione peroxidase</i> )
cAMP, cykliczny adenozy-3'-5'-monosforan (ang. <i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> )	nPHGPx, peroksydaza glutationowa nadtlenu fosfolipidów (ang. <i>phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase</i> )
CAT, katalaza (ang. <i>catalase</i> )	NOS, syntaza tlenku azotu (ang. <i>nitric oxide synthase</i> )
CFTR, błonowy regulator przewodnictwa zwią- zany z mukowiscydozą (ang. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )	OGG1, glikozylaza 1 8-oksyguaniny DNA (ang. <i>8-oxoguanine DNA glycosylase 1</i> )
FAD, dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. <i>flavin adenine dinucleotide</i> )	OS, stres oksydacyjny (ang. <i>oxidative stress</i> )
FSH, hormon folikulotropowy (ang. <i>follicle-stimulating hormone</i> )	OR, iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i> )
GPx4, cPHGPx, cytozolowa peroksydaza gluta- tionowa (ang. <i>cytosolic glutathione peroxidase</i> )	ORP, potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ang. <i>oxidation-reduction potential</i> )
G6PDH, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (ang. <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> )	PKA, kinaza A zależna od cAMP (ang. <i>protein kinase A</i> )
GPx, peroksydaza glutationowa (ang. <i>glutathione peroxidase</i> )	PKC, kinaza C zależna od diacyloglicerolu (ang. <i>protein kinase C</i> )
GR, reduktaza glutationowa (ang. <i>glutathione reductase</i> )	PLA2, fosfolipaza A2 (ang. <i>phospholipase A2</i> )
GSH, glutation (ang. <i>glutathione</i> )	PMN, granulocyty polimorfojądrowe (ang. <i>polymorphonuclear leukocytes</i> )
HMP, cykl heksozomonofosforanowy (ang. <i>hexose monophosphate shunt</i> )	PTK, kinaza tyrozynowa (ang. <i>protein tyrosine kinase</i> )
ICSI, docytoplazmatyczna iniekcja plemnika (ang. <i>intracytoplasmic sperm injection</i> )	PUFA, wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
IFN- $\gamma$ , interferon gamma (ang. <i>interferon gamma</i> )	
IMI, męska niepłodność idiopatyczna (ang. <i>idiopathic male infertility</i> )	

RFA, reaktywne formy azotu (ang. <i>reactive nitrogen species</i> )	sORP, statyczny/znormalizowany potencjał oksydacyjno–redukcyjny (ang. <i>static oxidation–reduction potential</i> )
RFT, reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i> )	TNF, czynnik martwicy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor</i> )
ROC curve, krzywa ROC (ang. <i>receiving operating characteristic</i> )	TSH, tyreotropina (ang. <i>thyroid-stimulating hormone</i> )
SCD, dyspersja chromatyny plemnika (ang. <i>sperm chromatin dispersion</i> )	TUNEL, znakowanie końców nici DNA przy użyciu terminalnej transferazy deoksynukleotydowej (ang. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling</i> )
SCSA, ocena wrażliwości DNA na kwaśną dena- turację z wykorzystaniem oranżu akrydyny (ang. <i>sperm chromatin structure assay</i> )	TZI, indeks teratozoospermii (ang. <i>teratozoospermia index</i> )
SD, odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i> )	UMI, męska niepłodność niewyjaśniona (ang. <i>unexplained male infertility</i> )
SDF, fragmentacja jądrowego DNA plemników, (ang. <i>sperm DNA fragmentation</i> )	WHO, Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i> )
SNV, mutacje pojedynczych nukleotydów (ang. <i>single nucleotide variants mutations</i> )	
SOD, dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i> )	



## STRESZCZENIE

**Wprowadzenie i cel badań.** Ponieważ standardowa ocena seminologiczna ma pewne ograniczenia w ocenie zdolności plemników do zapłodnienia, niezbędnym wydaje się wprowadzenie rozszerzonej i zaawansowanej oceny parametrów seminologicznych. Dodatkowa diagnostyka jest szczególnie uzasadniona ze względu na niepłodność idiopatyczną, w której standardowe parametry plemników są nieprawidłowe, bądź niewyjaśnioną, w której stwierdza się prawidłowe parametry. Wśród markerów niepłodności męskiej, które miałyby odpowiednią wartość prognostyczną i użyteczność kliniczną proponuje się status chromatyny plemników oraz potencjał oksydacyjno–redukcyjny nasienia (ORP, ang. *oxidation–reduction potential*) wyrażany jako sORP (ang. *static ORP*), bowiem liczne doniesienia potwierdzają kluczowe znaczenie prawidłowego statusu chromatyny plemników dla procesu zapłodnienia, rozwoju zarodka, uzyskania ciąży w warunkach fizjologicznych oraz w procedurach wspomaganego rozrodu, a także dla zdrowia potomstwa, jak również niekorzystny wpływ stresu oksydacyjnego w układzie płciowym męskim, w tym nasieniu na wymienione procesy i zjawiska. Obydwa biomarkery mogą być ze sobą powiązane, gdyż stres oksydacyjny jest znanym i obecnie powszechnym czynnikiem etiologicznym obniżenia integralności genomu plemników. Co więcej, czynniki wywołujące zarówno fragmentację DNA (SDF, ang. *sperm DNA fragmentation*), jak i stres oksydacyjny niejednokrotnie są tożsame. Ponadto 80% niepłodności idiopatycznej może być związane ze stresem oksydacyjnym w nasieniu. Obecnie proponuje się, że 20% plemników w ejakulacie z pofragmentowanym DNA jest wartością graniczną odróżniającą mężczyzn płodnych od niepłodnych. Z kolei, za stres oksydacyjny uznaje się wartość sORP  $>1,37 \text{ mV} \times 10^6$  plemników/mL.

Celem ogólnym w niniejszej dysertacji było znalezienie związku między konwencjonalną charakterystyką nasienia, integralnością genomu plemników, potencjałem oksydacyjno–redukcyjnym w nasieniu, a niepłodnością męską. Cele szczegółowe: 1. Porównanie konwencjonalnej charakterystyki nasienia, SDF i sORP w nasieniu między mężczyznami niepłodnymi

i płodnymi, 2. Wyłonienie grup badanych mężczyzn z SDF  $>20\%$  i z sORP  $>1,37 \text{ mV} \times 10^6$  plemników/mL w grupie mężczyzn niepłodnych i płodnych oraz porównanie częstości ich występowania. 3. Oszacowanie ryzyka na wystąpienie SDF  $>20\%$  i sORP  $>1,37 \text{ mV} \times 10^6$  plemników/mL w grupie mężczyzn niepłodnych i płodnych. 4. Ustalenie wartości predykcyjnej testów weryfikujących SDF i sORP w nasieniu dla odróżnienia mężczyzn niepłodnych od płodnych (poszukiwanie takiej wartości granicznej SDF i sORP, powyżej której zwiększa się ryzyko niepłodności męskiej).

**Materiał i metody.** Badania wykonane zostały na nasieniu mężczyzn, którzy jako ochotnicy zgłaszali się do Pracowni Andrologicznej Zakładu Histologii i Biologii Rozwoju Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM). Grupę badaną stanowili mężczyźni ( $n = 117$ ), u których stwierdzono niepłodność, natomiast grupę kontrolną mężczyźni płodni ( $n = 89$ ). Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej PUM. Podstawowa, rozszerzona i zaawansowana analiza nasienia została wykonana zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) z 2021 r. Integralność genomu plemników sprawdzono za pomocą diagnostycznego testu dyspersji chromatyny plemnika (SCD, ang. *sperm chromatin dispersion*), z kolei do weryfikacji stresu oksydacyjnego na podstawie wartości sORP, wykorzystano system elektrochemiczny MiOXSYS®. Uzyskane dane zostały poddane analizie statystycznej. Zastosowano test Shapiro–Wilka (ocena zgodności rozkładu zmiennych z rozkładem normalnym), nieparametryczny test U Manna–Whitneya (porównania zmiennych między dwiema niezależnymi grupami), test  $\chi^2$  (weryfikacja częstości pojawienia się parametru o określonej wartości) i test weryfikujący iloraz szans (OR, ang. *odds ratio*) na wystąpienie danych zdarzeń. Ponadto, przeprowadzono analizę krzywej ROC (ang. *receiver operating characteristic*) w celu określenia wartości predykcyjnej zastosowanych testów.

**Wyniki.** Mężczyźni niepłodni mieli istotnie mniejszą liczbę, ruchliwość i morfologię plemników oraz istotnie wyższy odsetek

plemników z pofragmentowanym DNA (mediana SDF = 20,00%) i istotnie wyższy potencjał oksydacyjno–redukcyjny w nasieniu (mediana sORP = 2,16) w porównaniu do mężczyzn płodnych (odpowiednio mediana SDF = 13,00%; mediana sORP = 0,66). Ponadto, wśród mężczyzn niepłodnych istotnie częściej występowały mężczyźni z SDF >20% oraz z sORP >1,37. Ryzyko na wystąpienie SDF >20% i sORP >1,37 było odpowiednio 3,5-krotnie i ponad 10-krotnie wyższe w porównaniu do mężczyzn płodnych. Analiza krzywej ROC wykazała, że w badanej populacji mężczyzn wartości SDF = 13% i sORP = 1,256 były wartościami granicznymi, powyżej których istniało statystyczne ryzyko niepłodności męskiej. Wartość pola powierzchni pod krzywymi ROC (odpowiednio AUC = 0,735; oraz AUC = 0,823) wskazywała na satysfakcjonującą wartość prognostyczną testu SCD i dobrą wartość prognostyczną testu weryfikującego sORP w nasieniu. Wartości AUC nie różniły się istotnie statystycznie.

**Wnioski.** 1. Istnieje związek między niepłodnością męską, konwencjonalną charakterystyką nasienia, integralnością genomu plemników i stresem

oksydacyjnym w nasieniu, 2. Mężczyźni niepłodni w porównaniu do mężczyzn płodnych mają zdecydowanie wysokie ryzyko na wystąpienie klinicznie znaczącego uszkodzenia jądrowego DNA plemników i wystąpienia stresu oksydacyjnego w nasieniu, co w konsekwencji może obniżyć zdolność ich plemników do zapłodnienia, zarówno w warunkach naturalnej koncepcji, jak i wspomaganej medycznie, 3. Zastosowane testy do oceny integralności genomu plemników i potencjału oksydacyjno–redukcyjnego w nasieniu mają istotną wartość prognostyczną dla odróżnienia mężczyzn niepłodnych od płodnych, 4. Jednoczesna weryfikacja integralności genomu plemników i stresu oksydacyjnego w nasieniu powinna stanowić istotne uzupełnienie standardowej oceny nasienia, ze względu na: a) możliwość wyjaśnienia ewentualnej przyczyny obniżonej zdolności plemników do zapłodnienia, b) prawidłowe postępowanie terapeutyczne związane z wprowadzeniem terapii antyoksydacyjnej, i c) spersonalizowane leczenie pacjenta, które może mieć na celu przywrócenie naturalnej płodności lub zwiększenie szansy na sukces reprodukcyjny w warunkach wspomaganego rozrodu.

## ABSTRACT

**Introduction and purpose of research.** Since the standard seminological assessment has certain limitations in assessing the ability of sperm to fertilize, it seems necessary to introduce an extended and advanced assessment of seminological parameters. Additional diagnostics is particularly justified due to idiopathic infertility, in which standard sperm parameters are abnormal, or unexplained infertility, in which the parameters are normal. Among the markers of male infertility that would have appropriate prognostic value and clinical usefulness, sperm chromatin status and sperm oxidation-reduction potential (ORP), expressed as sORP (static ORP), are recommended. Numerous reports confirm the important role of sperm chromatin status for the fertilization process, embryo development, achieving pregnancy (natural conception, assisted reproduction procedures), as well as for the health of the offspring. Moreover, detrimental effect of oxidative stress in the male reproductive system, including in semen on the mentioned processes and phenomena is also described. Both biomarkers may be related, because oxidative stress is known to be etiological factor to reduce sperm genomic integrity. Moreover, the factors causing both sperm DNA fragmentation (SDF) and oxidative stress are often the same. It should be highlighted that 80% of idiopathic infertility may be associated with oxidative stress in semen. The threshold of 20% SDF to distinguish fertile from infertile men is currently suggested. In turn, oxidative stress is considered to be at sORP  $>1.37 \text{ mV} \times 10^6$  sperm cells/mL.

The principal goal of this dissertation was to find the relationship between the conventional sperm characteristics sperm genomic integrity, oxidation–reduction potential in semen and male infertility. Detailed research objectives: 1. Comparison of conventional semen characteristics, SDF and sORP in semen between infertile and fertile men, 2. Frequency estimation of men with SDF  $>20\%$  (clinically significant level of DNA damage) and with sORP  $>1.37 \text{ mV}/10^6$  sperm cells/mL (oxidative stress in semen) in infertile and fertile men, 3. Calculation of the risk for SDF  $>20\%$  and sORP  $>1.37 \text{ mV}/10^6$  sperm cells/mL in semen of infertile and fertile men, 4. Verification of the

predictive value of testes revealing SDF and sORP in semen to distinguish infertile from fertile men (searching for the threshold values of SDF and sORP above which the risk for male infertility increases).

**Material and methods.** The study was performed on the semen of men – volunteers who report to the Andrology Laboratory of the Department of Histology and Developmental Biology of the Pomeranian Medical University in Szczecin (PUM). The study group consisted of infertile men ( $n = 117$ ) while control group – fertile men ( $n = 89$ ). The research was approved by the Bioethics Committee of the PUM. Basic, extended and advanced semen analysis was performed according to the guidelines provided by World Health Organization, 2021 (WHO, 2021). The integrity of the sperm genome was checked using the diagnostic sperm chromatin dispersion (SCD) test. In turn, oxidative stress in semen (based on sORP measurements) was verified by means on MiOXSYS® electrochemical system. The obtained data were subjected to statistical analysis. The Shapiro–Wilk test (assessment of compliance of the distribution of variables with the normal distribution), the non-parametric Mann–Whitney U test (comparisons of variables between two independent groups), the Chi<sup>2</sup> test (prevalence of study parameters with a given value) and the test verifying the odds ratio (OR) were used. Moreover, the ROC (receiver operating characteristic) curve analysis was performed to determine the predictive value of study tests.

**Results.** Infertile men had a significantly lower number, motility and morphology of sperm cells and a significantly higher percentage of spermatozoa with fragmented DNA (median SDF = 20.00%) and a significantly higher oxidation-reduction potential in semen (median sORP = 2.16) compared to fertile men (median SDF = 13.00%; median sORP = 0.66, respectively). Moreover, the prevalence of SDF  $>20\%$  and sORP  $>1.37$  was significantly higher in infertile men. The risk for SDF  $>20\%$  and sORP  $>1.37$  was 3.5-fold and over 10-fold higher respectively, compared to fertile men. ROC curve analysis showed that 13% SDF and 1.256 sORP were

the threshold values above which there was a statistical risk of male infertility in the study population. The value of the area under the ROC curves (AUC = 0.735 and AUC = 0.823, respectively) indicated a satisfactory prognostic value of the SCD test and a good prognostic value of the test verifying sORP in semen. AUC values did not differ statistically significantly.

**Conclusions.** 1. There is a relationship between male infertility, standard sperm parameters, the integrity of the sperm genome and oxidative stress in semen, 2. Infertile men, compared to fertile men, have a high risk of clinically significant damage to the nuclear DNA of sperm and oxidative stress in semen, which may consequently reduce the ability

of sperm cells to fertilize, both in the conditions of natural conception and medically assisted, 3. The tests used to assess the sperm genomic integrity and the oxidation-reduction potential in semen have an important prognostic value to distinguish infertile from fertile men, 4. Simultaneous verification of sperm genomic integrity and oxidative stress in semen should be an important complement to standard semen assessment due to: a) the possibility of explaining the cause of the reduced ability of sperm cells to fertilize, b) proper therapeutic procedures related to the introduction of antioxidant therapy, and c) personalized treatment of the patient, which may have an impact on to restore natural fertility or increase the chances of reproductive success under assisted reproduction.

# 1. WPROWADZENIE

## 1.1. Niepłodność męska

### 1.1.1. Definicja niepłodności. Epidemiologia

Niepłodność wg Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) to niemożność uzyskania ciąży u pary w ciągu 12 miesięcy regularnego współżycia (3–4-krotnie w tygodniu) bez stosowania środków antykoncepcyjnych (Agarwal i wsp., 2021; WHO, 2021). Jest to choroba cywilizacyjna, społeczna i stanowi istotny problemem zdrowia publicznego. Dotyczy nawet 20% par (do 186 milionów par) z całego świata, a liczba par poszukujących specjalistycznej pomocy medycznej stale rośnie (Agarwal i wsp., 2017a, 2019a,c; 2023; Castleton i wsp., 2022). Udział czynnika męskiego szacuje się od 20% do 70% przypadków niepłodności partnerskiej, w 1/3 stanowi czynnik izolowany (Agarwal i wsp., 2019a; 2021; 2022; 2023; Pan i wsp., 2018, Panner Selvam i wsp., 2021b).

Weryfikacja czynnika męskiego jest bardzo istotna w całościowym postępowaniu diagnostycznym pary niepłodnej (Alfaro Gomez i wsp., 2023; Calogero i wsp., 2023; Khatun i wsp., 2018; Panner Selvam i wsp., 2021a,b; 2022). Należy jednak podkreślić, że w wielu przypadkach czynnik męski jest pomijany, mimo iż przyczynia się do zaburzeń zapłodnienia, rozwoju zarodka, uzyskania ciąży oraz zaburzeń epigenetycznych. Szczególnie biorąc po uwagę wiek mężczyzny uważa się, że czynnik męski może być odpowiedzialny za nawracające poronienia oraz choroby potomstwa (choroby genetyczne dziedziczone w sposób autosomalny dominujący, zaburzenia neuro-behawioralne) (Agarwal i wsp., 2016c; 2019c; 2021; 2022; Brandt i wsp., 2019; Calogero i wsp., 2023; Cho i Agarwal, 2018; Farkouh i wsp., 2022; Kaltsas i wsp., 2023; Machałowski i wsp., 2020; Panner Selvam i wsp., 2021b).

Etiologia czynnika męskiego pozostaje nieokreślona u 30–50% pacjentów, u których stwierdza się nieprawidłowe podstawowe parametry plemników (WHO, 2010) bez dających się zidentyfikować przyczyn, nawet na podstawie kompleksowej i dostępnej obecnie diagnostyki specjalistycznej. Przypadki te klasyfikowane są jako niepłodność idiopatyczna (IMI, ang. *idiopathic male infertility*). Według dostępnego piśmiennictwa, okazuje się, że około 80% tej niepłodności jest związane ze stresem oksydacyjnym (OS, ang. *oxidative stress*) w nasieniu, z tego powodu wprowadzono termin MOSI (ang. *male oxidative stress infertility*) (Agarwal i wsp., 2019b,c; 2021; Alfaro Gomez i wsp., 2023; Castleton i wsp., 2022; Cho i Agarwal 2018; Corsini i wsp., 2023; Hamada i wsp., 2012; Majzoub i wsp., 2018, 2019; Panner Selvam i Agarwal, 2018).

Z kolei nawet u 40% mężczyzn stwierdza się niepłodność niewyjaśnioną (UMI, ang. *unexplained male infertility*). Odnoszona jest do grupy niepłodnych, u których podstawowe parametry nasienia są prawidłowe (WHO, 2010) i brak również innych istotnych zaburzeń w zakresie badania przedmiotowego oraz diagnostyki hormonalnej (Björndahl i wsp., 2023; Boeri i wsp., 2021; Corsini i wsp., 2023; Hamada i wsp., 2011, 2012; Ritchie i Ko, 2021).

### 1.1.2. Wieloczynnikowa etiopatogeneza niepłodności męskiej

Mężczyźni, u których udało się rozpoznać przyczynę niepłodności stanowią około 50–70% wszystkich przypadków. Wśród ustalonych przyczyn wyróżniamy trzy grupy czynników: przedjądrowe, jądrowe i pozajądrowe. Do czynników przedjądrowych zalicza się zaburzenia osi podwzgórzowo–przysadkowej

(m.in. hipogonadyzm, hiperprolaktynemia, zespół Cushinga), zaburzenia chromosomowe (najczęściej zespół Klinefeltera), nadmiar estrogenów i androgenów. Wśród przyczyn jądrowych wyróżnia się: wrodzone zaburzenia rozwoju i czynności jąder (brak jąder, dysgeneza gonad, zespoły Klinefeltera, Downa, Noonan) oraz nabyte uszkodzenia strukturalne (m.in. żyłki powrózka nasiennego, zapalenie i nowotwory jąder, skręt powrózka nasiennego, uszkodzenie komórek odpowiedzialnych za spermatogenezę). Spośród czynników nabytych najczęstszą i możliwą do wyleczenia przyczyną niepłodności u mężczyzn są żyłki powrózka nasiennego, z częstością występowania wynoszącą 40% (Agarwal i wsp., 2021; Assidi 2022; Mancini i wsp., 2023; Panner Selvam i wsp., 2021a,b; Słowikowska-Hilczer, 2021).

Do przyczyn pozajądrowych należą zaburzenia ruchliwości plemnika, zaburzenia jego połączenia z komórką jajową oraz grupa zaburzeń seksualnych. Istnieją również przyczyny mieszane dot. nieodpowiedniego trybu życia, są one związane ze stosowaniem używek, hipertermią jąder, stresem, zaburzeniami metabolicznymi (takimi jak otyłość, nieodpowiednie żywienie) oraz zaawansowanym wiekiem (Agarwal i wsp., 2021; Assidi 2022; Calogero i wsp., 2023; Finelli i wsp., 2022; Kotzbach 2021; Słowikowska-Hilczer, 2021).

### 1.1.3. Diagnostyka niepłodności męskiej

Do diagnostyki niepłodności męskiej należy: 1) dokładne zebranie wywiadu zdrowotnego, 2) pełne badanie fizykalne przez wykwalifikowany personel medyczny, 3) ocena seminologiczna (podstawowa, rozszerzona, zaawansowana), w razie wykrycia nieprawidłowości poszerzenie diagnostyki o 4) badania laboratoryjne oraz 5) badania obrazowe. Wywiad medyczny powinien uwzględniać m.in. przebyte choroby i zabiegi, stosowane leki, zdrowie seksualne, infekcje układu

moczowo-płciowego, narażenie na szkodliwe czynniki, używki, aktywność fizyczną, dietę oraz stosowania antyoksydantów. Do cech badania przedmiotowego należy oglądanie (ocena sylwetki, budowy ciała, cech maskulinizacji) oraz badania palpacyjne (prącia, jąder za pomocą orchidometru Pradera, najądrzy, powrózka nasiennego, kanału pachwinowego, badanie *per rectum*). Ocena seminologiczna należy do najbardziej fundamentalnych badań w diagnostyce męskiej niepłodności (Agarwal i wsp., 2021; Calogero i wsp., 2023; Neto i wsp., 2016; Oszukowska 2021; Salonia i wsp., 2023).

W niektórych sytuacjach klinicznych niezbędne jest poszerzenie diagnostyki o ocenę hormonów wpływających na prawidłowe funkcjonowanie układu płciowego męskiego i regulację osi podwzgórze–przysadka–mózgowa–gonada. Do tych hormonów należy hormon folikulotropowy (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*), hormon luteinizujący (LH, ang. *luteinizing hormone*), testosteron całkowity (TST, ang. *total testosterone*), estradiol, prolaktyna oraz tyreotropina (TSH, ang. *thyroid-stimulating hormone*). Ponadto, powinna być uwzględniona ocena genetyczna w celu wykluczenia zaburzeń kariotypu i mutacji w pojedynczych genach, np. weryfikacja mikrodelecji w regionie AZF (ang. *azoospermia factor*) zlokalizowanym w długim ramieniu chromosomu Y oraz mutacji w genie *CFTR* (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) odpowiedzialnym za mukowiscydozę (Assidi 2022, Calogero i wsp., 2023; Tanaka i wsp., 2022).

W ramach badań obrazowych powinno się wykonać badanie ultrasonograficzne, w trakcie którego ocenia się objętość jąder, obecność zmian ogniskowych, wyklucza się stany zapalne jąder i najądrzy, obecność mikrozwapnień, żyłaków powrózka nasiennego, zmian w obrębie stercza. Rzadko stosowanym narzędziem diagnostycznym są: rezonans

magnetyczny (wykorzystywany zwłaszcza w przypadku podejrzenia zmian w ośrodkowym układzie nerwowym) oraz wazografia (przy podejrzeniu niedrożności nasieniowodów) (*Agarwal i wsp., 2021; Assidi i wsp., 2022; Calogero i wsp., 2023; Neto i wsp., 2016; Oszukowska 2021; Salonia i wsp., 2023*).

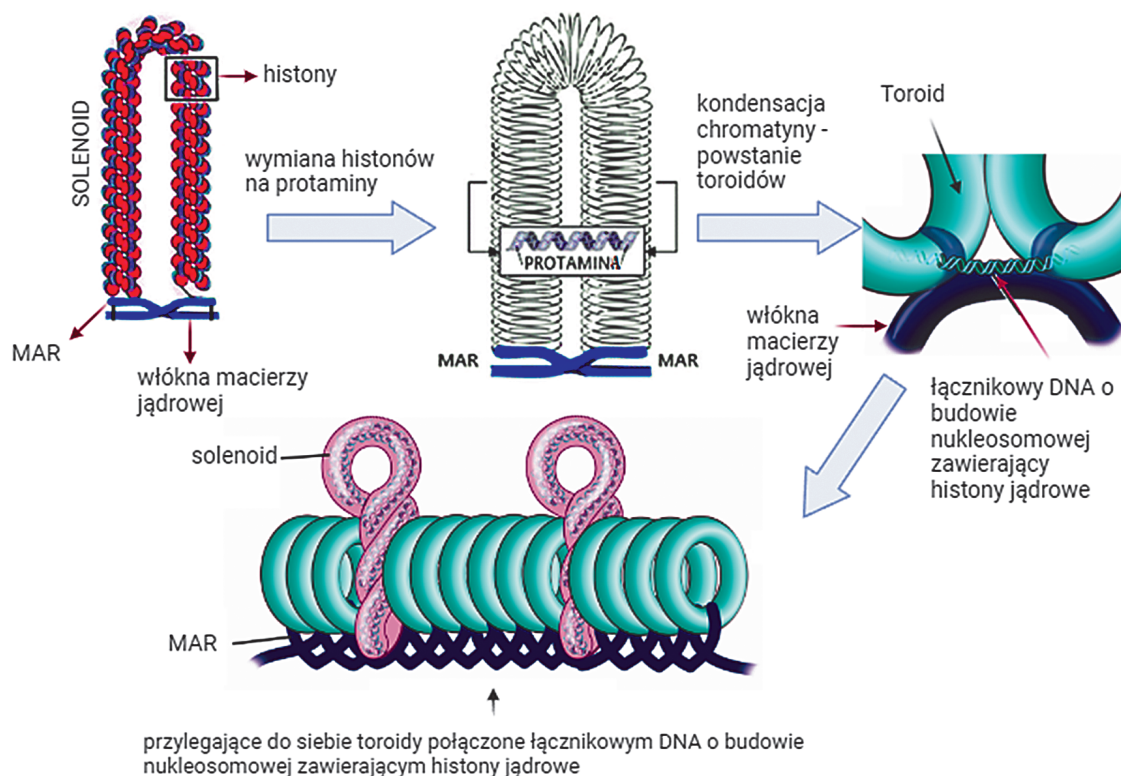
## 1.2. Chromatyna dojrzałego plemnika

### 1.2.1. Budowa chromatyny dojrzałego plemnika

Chromatyna w plemniku ma zdecydowanie odmienną budowę niż chromatyna występująca w komórkach somatycznych. Przede wszystkim jest ona 6–20-krotnie bardziej skondensowana, co powoduje zmniejszenie objętości jądra wysoce zróżnicowanych komórek germinalnych. Ostatecznie objętość jądra plemnika stanowi 5% objętości jądra komórki somatycznej. Tylko 5–15% chromatyny plemnika występuje w formie nukleosomowej zawierającej specyficzne histony – histony jądrowe. Rdzeń nukleosomu jest oktamerem histonów (H2A, H2B, H3 i H4), podlegających różnym modyfikacjom chemicznym (np. fosforylacja, metylacja, acetylacja). Na rdzeń nawinięty jest DNA. Należy zaznaczyć, że genom plemnika jest wysoce zmetylowany. Metylacji podlega przeważnie pirymidynowa zasada azotowa – cytozyna. Powstaje 5-metylocytozyna (5-mC). Okazuje się, że poziom metylacji w dojrzałym plemniku wynosi około 70%. Pomiędzy nukleosomami, podobnie jak w przypadku chromatyny komórek somatycznych, występuje histon H1. DNA zbudowany z powtarzających się jednostek jakimi są nukleosomy tworzy fibryłę chromatynową. Histon H1 odpowiedzialny jest za tworzenie struktur wyższego rzędu, czyli upakowanie nukleosomów w postaci solenoidu (**Rycina 1**) (*Gold i wsp., 2018; Hao i wsp., 2019; Mancini i wsp., 2023; Piasecka i wsp., 2021; Ribas-Maynon i wsp., 2022*).

Zdecydowana większość DNA plemnika połączona jest z protaminami (protamina 1 występująca u wszystkich ssaków, protamina 2 u człowieka i kilku innych gatunków), co sprzyja silnej kondensacji materiału genetycznego. Stwierdzono, że aż 85% DNA związanych jest z tymi białkami. Protamina 1 zawiera krótką domenę bogatą w serynę i argininę (do 48%) i tworzy stabilne połączenie z łańcuchem DNA. Rolą argininy jest neutralizacja ujemnego ładunku grupy fosforanowej nici DNA. Neutralizacji podlega ponad 90% grup fosforanowych. Co więcej, protaminy podlegają stabilizacji na skutek powstania wiązań/mostków dwusiarczkowych (-S-S-) wewnątrz protamin i pomiędzy nimi, wskutek utleniania grup tiolowych/sulfhydrylowych (-SH) cysteiny. Istotną rolę w tym procesie odgrywa peroksydaza glutationowa PHGPx (**patrz 1.3.3.1. Antyoksydanty enzymatyczne**). Tworzenie się tych wiązań nie tylko stabilizuje protaminy, ale również sprzyja zaawansowanej kondensacji DNA. Rozpoczyna się ona już podczas spermiogenezy i jest dalej kontynuowana w najądrzu (*Barati i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2021; Gold i wsp., 2018; Hao i wsp., 2019; Juarez-Rojas i wsp., 2022; Mancini i wsp., 2023; Ribas-Maynon i wsp., 2012, 2022; Singh i wsp., 2011; Ritchie i wsp., 2021*).

Protaminy umożliwiają tworzenie spiralnych pętli DNA, które upakowane są w struktury wyższego rzędu, czyli toroidy (zawierają 50–100 kilo par zasad). Pomiędzy przylegającymi toroidami znajduje się łącznikowy DNA o budowie nukleosomowej, który jest powiązany z włóknami macierzy jądrowej, czyli włóknami szkieletu jądrowego. Miejsce wiązania się tego DNA z włóknami macierzy w nomenklaturze anglojęzycznej nosi nazwę regionu MAR (ang. *matrix attachment region*) (**Rycina 1**). Należy zaznaczyć, że obszar MAR jest wrażliwy na aktywność



**Rycina 1.** Budowa chromatyny plemnika (szczegóły w tekście)  
(Piasecka i wsp., 2021; Ribas-Maynon i wsp., 2022; Singh i wsp., 2011)

topoizomerazy II, natomiast łącznikowe pętle DNA podlegają działaniu DNazy (Gold i wsp., 2018; Hao i wsp., 2019; Okada, 2022b; Piasecka i wsp., 2021; Podgornaya 2022; Ribas-Maynon i wsp., 2012, 2022).

## 1.2.2. Etiopatogeneza uszkodzeń jądrowego DNA plemników

### 1.2.2.1. Zaburzenia spermiogenezy – nieprawidłowa aktywność topoizomerazy II

Podczas spermiogenezy następuje przebudowa materiału genetycznego różnicujących się spermatyd. Jest to proces wieloetapowy zdeteminowany współdziałaniem licznych genów, różnych czynników molekularnych i enzymów. Ponieważ chromatyna okrągłej spermatydy ma budowę nukleosomową i zawiera histony jądrowe wchodzące w skład nukleosomów musi nastąpić wymiana tych histonów

na białka przejściowe (dwa rodzaje białek przejściowych TP1 i TP2), a te z kolei odpowiednio na protaminę 1 i 2. Destabilizacja budowy nukleosomowej poprzedzona jest wcześniej modyfikacją histonów somatycznych spermatocytów pachytenowych (ubikwitynacja, fosforylacja, ADP-rybozylacja, metylacja, sumoilacja). Ostatecznie wymienione są na histony jądrowe (Francis i wsp., 2014; Garcia-Rodriguez i wsp., 2019; Hao i wsp., 2019; Okada 2022a, b; Piasecka i wsp., 2021). Należy zaznaczyć, że wymiana histonów jądrowych na białka przejściowe wymaga hiperacetytacji histonu H4 i aktywności topoizomerazy II, która odpowiada za powstawanie fizjologicznie występujących przejściowych podwójnych nacięć nici DNA. Aktywność tego enzymu powoduje rozluźnienie struktury nici DNA i zmniejszenie jej naprężeń wynikających z superspiralizacji. Bez tych



nacięć niemożliwe jest wbudowanie białek przejściowych. Kolejnym etapem jest usunięcie tych białek i wbudowywanie protaminy 1 i 2. Jest to proces protaminacji zachodzący w wydłużających się spermatydach. W końcowej reorganizacji DNA plemnika następuje łączenie wolnych końców DNA. Jest to tzw. ligacja, za którą odpowiada także topoizomeraza II, co więcej mająca zdolność naprawy DNA. Zatem za prawidłową integralnością genomu plemników odpowiada topoizomeraza II. Należy zaznaczyć, że jej aktywność jest kontrolowana przez polimerazę poli (ADP-rybozy) (*Francis i wsp., 2014; Garcia-Rodriguez i wsp., 2019; Hao i wsp., 2019; Okada 2022a, b; Piasecka i wsp., 2021*).

W przypadku nieprawidłowej aktywności wymienionych enzymów dochodzi do przetrwałych patologicznych endogennych nacięć DNA (brak procesu ligacji wolnych końców DNA), a w efekcie pofragmentowania materiału genetycznego i nieprawidłowej protaminacji, co skutkować może niepłodnością męską (*Cannarella i wsp., 2020; Francis i wsp., 2014; Garcia-Rodriguez i wsp., 2019; Gold i wsp., 2018; Okada 2022a, b; Panner Selvam i wsp., 2021a; Piasecka i wsp., 2021; Ribas-Maynon i wsp., 2022; Watanabe 2022*).

#### 1.2.2.2. Apoptoza

Apoptoza jest zjawiskiem fizjologicznym charakteryzującym się komórkowymi modyfikacjami biochemicznymi i morfologicznymi, które zapewniają kontrolowaną śmierć komórki. Proces ten zachodzi w wielu komórkach organizmu człowieka, również stwierdza się go w komórkach germinalnych nabłonka plemnikotwórczego (*Asadi i wsp., 2021; Evans i wsp., 2021*). Zaobserwowano, że nawet do 75% tych komórek ulega apoptozie, co zdecydowanie jest uzasadnione, gdyż ma to na celu: 1) zredukowanie populacji komórek nabłonka plemnikotwórczego do takiej liczby, która

mogłaby być wspierana przez „opiekuńcze” komórki Sertolego uczestniczące w tworzeniu bariery krew–jądro, 2) wybiórczą eliminację komórek nieprawidłowych, 3) powstanie fali apoptotycznej przed pokwitaniem, co związane jest z rozwojem prawidłowej spermatogenezy. W omawianych przypadkach proces apoptozy dotyczy komórek germinalnych, które nie są wysoce zróżnicowane i całkowicie podlegają eliminacji (*Asadi i wsp., 2021; Evans i wsp., 2021; Sakkas i Alvarez, 2010*).

Do jednych z hipotez powstawania uszkodzeń genomu plemnika należy proces „nieudanej apoptozy” (ang. “*abortive apoptosis*”), która w tym przypadku dotyczy komórek germinalnych podlegających zróżnicowaniu lub już zróżnicowanych. Komórka wchodząca na drogę apoptozy z powodu zaburzeń DNA (nieudana naprawa DNA, błędy w procesie replikacji DNA) może “uciec” z tego procesu i fizycznie nie podlegać procesowi eliminacji. Zróżnicowane spermatydy mimo, iż wykazują morfologiczne, bądź też molekularne zaburzenia, nie są jednak przyczyną do kontynuowania apoptozy i eliminacji tych komórek z nabłonka plemnikotwórczego. Sugeruje się, że w takich przypadkach brak jest synchronizacji spermatogenezy z apoptozą komórek plemnikotwórczych, podlegają one dalej różnicowaniu i pojawiają się w ejakulacie mając cechy programowanej śmierci. Można stwierdzić w nich ekspresję białek związanych z apoptozą, np. receptor śmierci Fas, białko p53, Bcl-2, kaspaz oraz obniżenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, a także nacięcia DNA. Ponadto na powierzchni gamet męskich można zidentyfikować fosfatydyloserynę, która we wczesnej apoptozie jest relokowana z wewnętrznego listka błony komórkowej do zewnętrznego (*Agarwal i wsp., 2020a, 2020b; Aitken 2017b; Bibov i wsp., 2018; Boguenet i wsp., 2021; Budzińska i wsp., 2024; Evans i wsp., 2021; Grunewald i wsp.,*

2017; *Garcia-Rodriguez i wsp.*, 2019; *Panner Selvam i wsp.*, 2021a; *Sakkas i Alvarez*, 2010).

Aktywowanie kaspaz (proteazy cysteinowe), które są wykonawcami apoptozy i w konsekwencji powodują degradację DNA komórek uszkodzonych odbywa się szlakiem zewnątrz- i wewnątrzpochodnym. W pierwszym przypadku apoptoza inicjowana jest przez Fas ligandy (FasL) lub czynnik martwicy nowotworów (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) łączące się z receptorami śmierci odpowiednio Fas lub TNF typu 1 znajdującymi się w błonie komórkowej, stąd nazwa apoptoza receptorowa. W procesie tym uczestniczą komórki Sertolego i limfocyty T, które wykazują ekspresję FasL. W konsekwencji dochodzi do rekrutacji inicjatorowej kaspazy 8, a następnie wykonawczej 3, co dalej powoduje fragmentację DNA (*Agarwal i wsp.*, 2020b; *Asadi i wsp.*, 2021; *Evans i wsp.*, 2021; *Sharma i wsp.*, 2023).

Z kolei apoptoza odbywająca się na drodze wewnątrzpochodnej inicjowana jest przez czynniki, które uszkodzają DNA komórek. Szlak wewnątrzpochodny związany jest z mitochondriami, które uwalniając cytochrom c aktywują inicjatorową kaspazę 9, następnie kaspazy wykonawcze 3, 6 i 7. W konsekwencji dochodzi do fragmentacji DNA (*Aitken i Lewis*, 2023; *Aitken i wsp.*, 2015; *Bibov i wsp.*, 2018; *Boguenet i wsp.*, 2021; *Evans i wsp.*, 2021; *Sharma i wsp.*, 2023). Dobrze poznanym czynnikiem wywołującym apoptozę plemników są reaktywne formy tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*), głównie generowane przez uszkodzony łańcuch oddechowy mitochondrów. RFT powodując peroksydację lipidów przyczyniają się do powstania silnie toksycznych aldehydów. Te ostatnie wiążąc się z białkami mitochondrialnymi wtórnie uszkodzają łańcuch oddechowy i zwiększają generowanie przez niego RFT ([patrz 1.3.6. Kliniczne konsekwencje stresu oksydacyjnego](#)). Ostatecznie RFT, obok uszkodzenia mitochondrialnego DNA, inicjują

apoptozę plemników szlakiem wewnątrzkomórkowym zależnym od mitochondriów (*Agarwal i wsp.*, 2020b; *Aitken i wsp.*, 2015, 2022; *Aitken i Lewis*, 2023; *Asadi i wsp.*, 2021; *Barati i wsp.*, 2020; *Bibov i wsp.*, 2018; *Boguenet i wsp.*, 2021; *Evans i wsp.*, 2021; *Sharma i wsp.*, 2023).

Należy zauważyć, że w przypadku plemników ma miejsce tzw. skrócona i domyślna apoptoza (ang. *truncated default intrinsic apoptotic cascade*). Może wystąpić w spermatydach, plemnikach jądrowych, najądrzowych i po ejakulacji, w warunkach gdy zmniejsza się dostępność czynników przeżycia lub jest ich brak. Ten proces apoptozy zdecydowanie obniża jakość plemników. Spada ich ruchliwość, żywotność i zmniejsza się potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, co więcej zwiększa się uszkodzenie DNA plemników nie tyle przez aktywację kaspaz, ile przez RFT. Kaspazy i nukleazy aktywowane podczas apoptozy nie są w stanie zdegradować DNA wysoce zróżnicowanych komórek germinalnych, w tym plemników, gdyż istnieje przeszkoda natury fizycznej: 1) jądro plemnika odseparowane jest od wstawki zawierającej mitochondria 2) chromatyna plemnika jest wysoce skondensowana. Zatem nacięcia DNA plemników, które przechodzą apoptozę szlakiem wewnątrzpochodnym zależnym od mitochondriów, są efektem oksydacyjnego uszkodzenia (*Aitken i Lewis*, 2023; *Aitken i wsp.*, 2015, 2022; *Bibov i wsp.*, 2018; *Budzińska i wsp.*, 2024).

### 1.2.2.3. Reaktywne formy tlenu – stres oksydacyjny

Oksydacyjne uszkodzenia DNA zostały opisane w rozdziale: [patrz 1.3.6. Kliniczne konsekwencje stresu oksydacyjnego](#).

## 1.3. Stres oksydacyjny w nasieniu

Termin „stres oksydacyjny” został po raz pierwszy wymieniony w literaturze w 1970 r., natomiast jako koncepcja w biologii i medycynie

Tabela 1. Podział reaktywnych form tlenu wraz z przykładami

Wolne rodniki	Reaktywne formy tlenu niebędące wolnymi rodnikami
anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet -}$ )	Nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ )
rodnik hydroksylowy ( $OH^{\bullet}$ )	Tlen singletowy ( $^1O_2$ )
rodnik wodorotlenkowy ( $HO_2^{\bullet}$ )	Ozon ( $O_3$ )
rodnik alkoksylowy ( $RO^{\bullet}$ ), peroksyłowy ( $RO_2^{\bullet}$ )	Kwas podchlorawy ( $HOCl$ )

został sformułowany w 1985 r. zdefiniowano go jako zachwianie równowagi między wytwarzaniem RFT, a antyoksydacyjnym ochronnym działaniem. W takim przypadku ma miejsce generowanie patologicznych ilości RFT (źródła endo- i egzogenne) wobec niewydolności ich neutralizacji za pomocą antyoksydantów (enzymatycznych i nieenzymatycznych). Zatem procesy utleniania przeważają nad procesami redukcji, co w konsekwencji prowadzi do oksydacyjnych uszkodzeń makromolekuł plemnika i w efekcie obniżenia parametrów seminologicznych. W warunkach fizjologicznych produkcja RFT jest w równowadze z ich unieczynnianiem. Niewielkie ilości tych związków są niezbędne dla funkcji plemnika (Azzi, 2022; Esteves, 2019; Frączek i Kurpisz, 2005; Panner Selvam i wsp., 2021b; 2022; Rana i Agarwal 2020; Takalani i wsp., 2023; Walczak-Jędrzejowska, 2015).

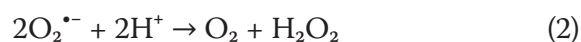
### 1.3.1. Reaktywne formy tlenu

Do RFT należą wolne rodniki (substancje, które posiadają jeden albo więcej niesparowanych elektronów) oraz związki, które nie należą do grupy wolnych rodników (Tabela 1). RFT są grupą związków chemicznych, które tworzone są po niekompletnej redukcji 1-, 2- lub 3-elektronowej cząsteczki tlenu ( $O_2$ ) (Rycina 2). Tlen jako cząsteczka występować może w stanie trypletowym ( $^3O_2$ )<sup>1</sup> i sin-

gletowym ( $^1O_2$ )<sup>2</sup> (Azzi, 2022; Esteves, 2019; Frączek i Kurpisz, 2005; Panner Selvam i wsp., 2022; Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008; Rana i Agarwal 2020; Sarniak i wsp., 2016; Walczak-Jędrzejowska, 2015; Yang i wsp., 2019). Tlen cząsteczkowy (trypletowy) z racji braku możliwości znalezienia partnerów do reakcji 4-elektronowej, wstępuje na drogę 1-elektronową. Do rodników wyjściowych, które formowane są podczas tej reakcji należy anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet -}$ ) (1) (Rycina 2).



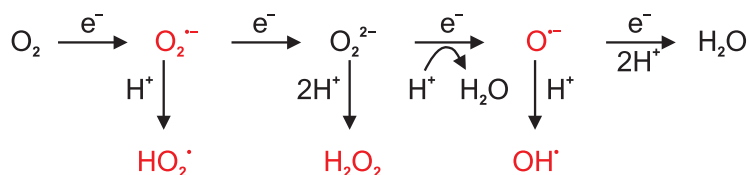
Związek ten posiada zarazem zdolności utleniające i redukujące. Obecność anionorodnika ponadtlenkowego prowadzić może do powstania kolejnych reaktywnych form tlenu, o zwiększonej reaktywności. Po dostarczeniu protonów anionorodnik ulega reakcji dysmutacji (dysproporcjonowania) do nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) i tlenu cząsteczkowego w sposób spontaniczny lub enzymatyczny (2) (Rycina 2). Katalizatorem reakcji jest enzym dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*).



Nadtlenek wodoru powstawać może również jako efekt rozpadu ozonu ( $O_3$ ) (3) lub wskutek przyłączenia jednego elektronu

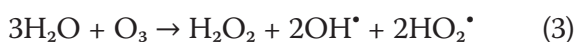
<sup>1</sup> Stanem podstawowym tlenu jest tlen trypletowy mający dwa niesparowane elektrony, jest on birodnikiem, nie wchodzi łatwo w reakcje utleniania i redukcji z uwagi na posiadanie dwóch elektronów o równoległych spinach. Z tego powodu tlen trypletowy o wiele łatwiej ulega reakcji ze związkami jednoelektronowymi – przyjmuje od nich jeden elektron.

<sup>2</sup> O tlenie singletowym mówimy gdy wypadkowy spin elektronów w cząsteczce wynosi zero i spiny te uległy sparowaniu. Jest to bardziej reaktywna forma tlenu, powstaje podczas reakcji wzbudzenia cząsteczki tlenu trypletowego za pomocą promieniowania nadfioletowego, promieniowania o wyższej energii albo reakcji chemicznych.

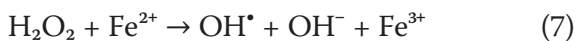


Rycina 2. Etapy powstawania reaktywnych form tlenu (szczegóły w tekście)

do anionorodnika ponadtlenkowego (4). Jest także produktem 2-elektronowej redukcji tlenu tripletowego (5) (Rycina 2).



$\text{H}_2\text{O}_2$  jako cząsteczka elektrycznie obojętna ma łatwość przenikania do wnętrza komórki, co w konsekwencji powoduje jej uszkodzenie. Dodatkowo łatwo przekształca się w rodnik hydroksylowy ( $\text{OH}^\bullet$ ) – jeden z najsilniejszych poznanych utleniaczy (6). Ponadto, ma łatwość wchodzenia w reakcje chemiczne z metalami przejściowymi, tj. pierwiastkami należącymi do „bloku d” w układzie okresowym pierwiastków (miedź, żelazo, mangan, chrom, kobalt) – reakcja Fentona (7). Produktem tej reakcji jest wspomniany rodnik  $\text{OH}^\bullet$ . Reakcja może być katalizowana przez inne jony metali (np. miedzi, niklu, kobaltu, chromu) ulegające reakcjom redoks. Wystarczające są już ich śladowe stężenia. W razie braku dostępności jonów żelazowych ( $\text{Fe}^{2+}$ ) mogą one zostać odtworzone w reakcji utleniania i redukcji w obecności anionorodnika ponadtlenkowego (8) (Azzi, 2022; Frączek i Kurpisz, 2005; Mannucci i wsp., 2022; Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2010; Sarniak i wsp., 2016; Siddiqui i wsp., 2015; Walczak-Jedrzejska, 2015).



Ponadto  $\text{H}_2\text{O}_2$  ma zdolność do utlenienia jonów chlorkowych do kwasu podchlorkowego ( $\text{HOCl}$ ) wykazującego silne właściwości oksydacyjne, a przez to bakteriobójcze (9). Katalizatorem tej reakcji jest mieloperoksydaza występująca w ziarnistościach neutrofilii.



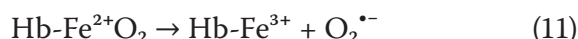
Należy wspomnieć także, że  $\text{H}_2\text{O}_2$  może reagować z  $\text{O}_2^{\bullet -}$ . Katalizatorem tej reakcji są jony żelazawe (reakcja Habera–Weissa) (10).



Innym związkiem należącym do RFT jest wspomniany wcześniej tlen singletowy (patrz przypis 2), który mimo, że nie należy do grupy wolnych rodników, ma większą energię cząsteczki niż tlen tripletowy i oddziałuje na inne cząsteczki, mając możliwość przekazania swojej energii wzbudzenia. Stąd też wykazuje silne właściwości uszkodzające kwasy nukleinowe, kwasy tłuszczowe i białka (Azzi, 2022; Mannucci i wsp., 2022; Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008; Siddiqui i wsp., 2015; Walczak-Jedrzejska, 2015).

Do RFT należą również rodniki alkoksylowe ( $-\text{RO}^\bullet$ ) i peroksyłowe ( $\text{RO}_2^\bullet$ ), które powstają w wyniku reakcji RTF ze związkami organicznymi, np. białkami i lipidami. Nie można pominąć faktu, że utlenianie hemoglobiny i mioglobiny może prowadzić do powstania  $\text{O}_2^{\bullet -}$ . Hemoglobina ulega spontanicznej reakcji autooksydacji, tj. przejścia z oksyhemoglobiny ( $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{O}_2$ ) do methemoglobiny ( $\text{Hb-Fe}^{3+}$ ) (11). Stężenie hemoglobiny kontrolowane jest przez reduktazę methemoglobinową,

która redukuje methemoglobinę do hemoglobiny.



### 1.3.2. Reaktywne formy azotu

Należy wspomnieć również o ważnych i powszechnie występujących reaktywnych formach azotu (RFA, ang. *reactive nitrogen species*) (Tabela 2). Należy do nich rodnik tlenku azotu ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) i dwutlenku azotu ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ) oraz związki niebędące wolnymi rodnikami: kwas azotawy ( $\text{HNO}_2$ ), tritlenek diazotu ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) oraz kwas nadtlenoazotawy ( $\text{HNO}_3$ ). Rodnik tlenku azotu (II) dzięki aktywności syntazy tlenku azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*) jest tworzony podczas reakcji metabolicznej z L-argininy (12).

Tabela 2. Podział reaktywnych form azotu wraz z przykładami

Wolne rodniki	Reaktywne formy azotu niebędące wolnymi rodnikami
Tlenek azotu ( $\text{NO}^{\bullet}$ )	Kwas azotawy ( $\text{HNO}_2$ )
Dwutlenek azotu ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ )	Tritlenek diazotu ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )
	Kwas nadtlenoazotawy ( $\text{HNO}_3$ )



$\text{NO}^{\bullet}$  ma zdolność reagowania z anionorodnikiem ponadtlenkowym tworząc istotny nadtlenoazotyn ( $\text{NO}_3^-$ ), prowadzi do unieczynnienia dwóch toksycznych rodników (13)



Z kolei anion  $\text{NO}_3^-$  w środowisku kwaśnym może przyczynić się do powstania następnego rodnika azotowego, jakim jest  $\text{NO}_2^{\bullet}$  oraz toksycznego  $\text{OH}^{\bullet}$  (14) (Azzi, 2022; Mannucci i wsp., 2022; Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008; Siddiqui i wsp., 2015; Walczak-Jedrzejowska, 2015).



### 1.3.3. Antyoksydanty w nasieniu

Do zapewnienia prawidłowego funkcjonowania organizmu niezbędna jest prawidłowa równowaga między produkcją RFT a działaniem mechanizmów ochronnych systemu oksydacyjnego, czyli zapobieganie reakcji RFT ze składnikami komórki, przerwanie reakcji wolnorodnikowych już rozpoczętych oraz usunięcie skutków tych reakcji dla organizmu. Z uwagi na strategiczną rolę męskiego układu płciowego istnieje wiele enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów usuwających RFT z plemnika i plazmy nasienia (Tabela 3). W nasieniu obecna są także prostatosomy, które biorą udział w neutralizacji RFT (Agarwal i wsp., 2023; Baskaran i wsp., 2021; Frączek i wsp., 2005; Ronquist 2015; Vickram i wsp., 2020; 2022).

Tabela 3. Podział antyoksydantów

Enzymatyczne:
Dysmutaza ponadtlenkowa
Katalaza
Peroksydaza glutationowa
Reduktaza glutationowa
S-transferaza glutationowa
Nieenzymatyczne:
Glutation
Witaminy (A, C, E, B)
L-karnityna, L-acetylkarnityna
Koenzym Q <sub>10</sub>
N-acetylocysteina, homocysteina
Laktoferyna
mikroelementy (Se, Zn, Cu)
Flawonoidy
Transferyna
Kwas foliowy
Kwas moczowy
Bilirubina
Tauryna, hipotauryna

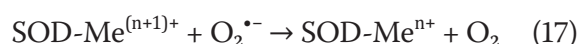
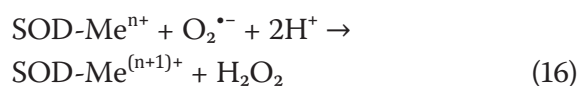
#### 1.3.3.1. Antyoksydanty enzymatyczne

Podstawowym enzymatycznym systemem antyoksydacyjnym jest tzw. triada enzymatyczna, w skład której wchodzi: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa (Agarwal i wsp., 2019c, 2023; Dutta i wsp., 2019; 2022; Mancini i wsp., 2023;

*Mannucci i wsp., 2022; Marchlewicz i wsp., 2016; Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Majzoub i wsp., 2018; O'Flaherty i Scarlata, 2022; Sheweita i wsp., 2022; Takalani i wsp., 2023; Walczak-Jędrzejowska 2015; Yamasaki i wsp., 2022).*

### Dysmutaza ponadtlenkowa

W ludzkim organizmie wyróżniamy 3 rodzaje dysmutazy ponadtlenkowej: 1) cytoplazmatyczna cynkowo-miedziowa (SOD-1, Cu-ZnSOD), 2) mitochondrialna manganowa (SOD-2, MnSOD) i 3) zewnątrzkomórkowa cynkowo-miedziowa (SOD-3/EC-SOD, Cu-ZnSOD). Wszystkie dysmutazy biorą udział w dwuetapowej reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do  $H_2O_2$  i tlenu cząsteczkowego (15). Pierwszym etapem tej reakcji jest redukcja anionorodnika ponadtlenkowego (jego neutralizacja) kosztem utleniania jonu metalu (grupy prostetycznej enzymu). W wyniku czego powstaje  $H_2O_2$  (16). W drugim etapie ma miejsce utlenianie anionorodnika ponadtlenkowego kosztem redukcji jonu metalu. Produktem tej reakcji jest tlen cząsteczkowy (17) (*Ancuelo i wsp., 2021; Agarwal i wsp., 2019c; 2023; Dutta i wsp., 2019; 2022; Marchlewicz i wsp., 2016; Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Majzoub i Agarwal; 2018; O'Flaherty i Scarlata, 2022; Sheweita i wsp., 2022; Walczak-Jędrzejowska 2015; Yamasaki i wsp., 2021).*



Dysmutaza SOD-1, kodowana na 21. chromosomie, występuje w postaci homodimerów (masa cząsteczkowa 32 kDa). Enzym ten stwierdza się w plazmie nasienia (75% całkowitej aktywności SOD w plazmie nasienia),

w plemnikach, w najądrzu, płynie śródmiąższowym, limfie i krwi. Z kolei SOD-2 kodowana na 6. chromosomie będąca homotetramerem (masa cząsteczkowa 96 kDa) obecna jest w macierzy mitochondriów wstawki plemnika. W komórkach somatycznych wykryto ją także w jądrze w komórkowym, lizosomach i peroksysomach oraz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Natomiast SOD-3 (kodowana na chromosomie 4. homotetramer, masa cząsteczkowa 135 kDa) ujawniono w kanalikach nasiennych, plazmie nasienia (25% całkowitej aktywności SOD w plazmie nasienia) i najądrzu. Należy podkreślić, że plazma nasienia zawiera większą ilość aktywnej SOD niż inne płyny pozakomórkowe, głównym ich źródłem jest prostata (*Ancuelo i wsp., 2021; Azzi 2022; Brieger 2012; Frączek 2005; Gacko i wsp. 2006; Gupta i wsp., 2021; Mancini i wsp., 2023; Mannucci i wsp., 2021; Marchlewicz i wsp., 2016; Walczak-Jędrzejowska 2015).*

### Katalaza

Do jednych z najbardziej efektywnych enzymatycznych antyoksydantów w nasieniu, oprócz dysmutazy ponadtlenkowej, należy katalaza (CAT, ang. *catalase*). Występuje ona w formie tetrametru, zawiera grupę prostetyczną-hemową oraz miejsce wiązania dla koenzymu – fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP<sup>+</sup> – forma utleniona). Znajduje się we wszystkich organizmach tlenowych: w peroksysomach, mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym oraz cytozolu komórek takich jak erythrocyty, komórki wątroby, szpiku lub nerki. Gen *CAT* kodujący katalazę znajduje się na chromosomie 11. Jej źródłem w plazmie nasienia jest prostata. Wykryto ją także w plemnikach i najądrzu. Enzym ten bierze udział w neutralizacji nadtlenu wodoru do tlenu cząsteczkowego i wody (18) (*Dutta i wsp., 2019; Gupta i wsp., 2021; Marchlewicz i wsp., 2016;*

*Nandi i wsp., 2019; Sarniak i wsp., 2016; Sies i wsp., 2020).*

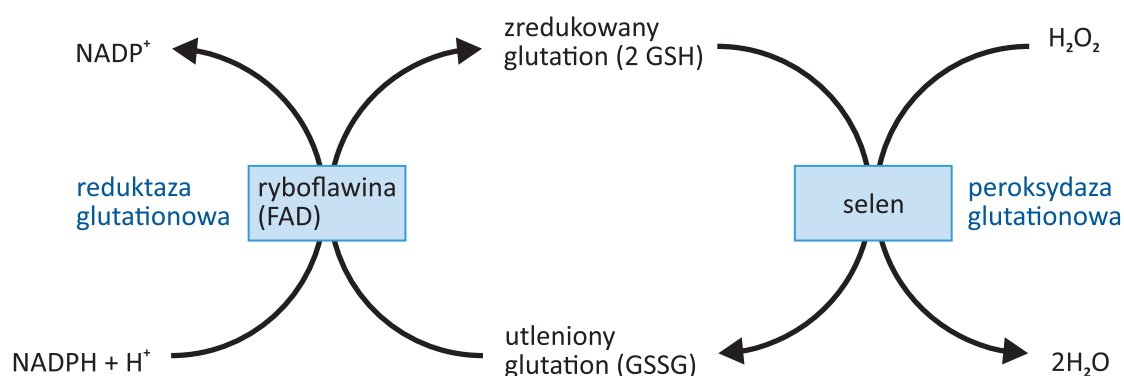


### Peroksydaza glutationowa

Kolejnym istotnym enzymem, biorącym udział w ochronie komórki przed działaniem nieorganicznych nadtlenków (np.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i organicznych (np. lipidów<sup>3</sup>) jest peroksydaza glutationowa (GPx, ang. *glutathione peroxidase*). Z reguły występuje w postaci tetrameru z atomem

(flawoproteina – flawoenzym). Funkcją GR jest redukcja GSSG do GSH, przy udziale zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ). Zapewnia to cykliczną redukcję  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Rycina 3**).

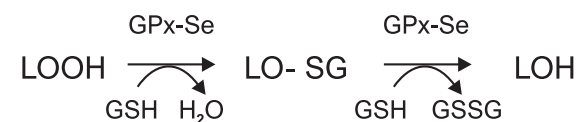
Ponadto, GPx – jak wspomniano wcześniej – ma zdolność redukcji nadtlenków lipidów (LOO) (występujących także w postaci wodoronadtlenków chroniąc je przed uszkodzeniem i tworzeniem z nich toksycznych aldehydów. Redukcja ich odbywa się również przy udziale GSH. W efekcie powstają



**Rycina 3.** Udział peroksydazy glutationowej (GPx-Se) w redukcji nadtlenu wodoru przy udziale zredukowanej formy glutationu (GSH). Utleniona forma glutationu (GSSG) ulega redukcji dzięki aktywności reduktazy glutationowej (GR) (szczegóły w tekście)

seleniu, związanym z cysteiną, w każdej z podjednostek. Bierze ona udział w reakcji redukcji  $\text{H}_2\text{O}_2$  do  $\text{H}_2\text{O}$  z udziałem zredukowanej formy glutationu (GSH, ang. *glutathione*). W wyniku redukcji  $\text{H}_2\text{O}_2$  zredukowana forma glutationu przekształca się w jego formę utlenioną – dwusiarczek glutationu (GSSG). Taka redukcja nadtlenu wodoru zapobiega jego przekształceniu w reakcji Fentona w bardziej toksyczny rodnik  $\text{OH}^\bullet$  (7). GPx ściśle współdziała z reduktazą glutationową (GR, ang. *glutathione reductase*) zawierającą jako grupę prostetyczną dinukleotyd flawinoadeniny (FAD, ang. *flavin adenine dinucleotide*)

pochodne hydroksylowe wodoronadtlenków lipidów (LOH) (**Rycina 4**) (*Ahmadi i wsp., 2016; Barati i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2021; Gałęcka i wsp., 2008; Handy i wsp., 2022; Jelezarsky i wsp., 2008; Walczak-Jędrzejowska i wsp., 2013*).



**Rycina 4.** Udział peroksydazy glutationowej (GPx-Se) w redukcji wodoronadtlenków lipidów (LOOH) do ich pochodnych hydroksylowych (LOH) z formą selenodisulfidową (LO-SG) jako formą pośrednią

Wyróżnia się 5 rodzajów GPx (GPx1–GPx5). GPx1 jest enzymem cytozolowym, podobnie jak GPx2. Z kolei GPx3 to enzym występujący w osoczu. Jest to forma wydzielnicza enzymu.

<sup>3</sup> Nadtlenuki lipidów to produkty reakcji peroksydacji lipidów (LOO). Są one następnie metabolizowane do akroleiny, 4-hydroksynonenalu (4-HNE) oraz dialdehydu malonylowego (MDA), których stężenie świadczyć może o zwiększonej ilości RFT i przewagi procesów utleniania nad procesami redukcji.

Wykryto ją w najądrzu. Z kolei GPx5 (seleno-niezależna) to enzym specyficzny dla najądrza. Występuje w plazmie nasienia (z prostaty) i macierzy mitochondriów wstawki plemnika. Natomiast GPx4 znana również jako nPHGPx – peroksydaza glutationowa nadtlenków fosfolipidów (ang. *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*) jest enzymem głównie związanym z błonami (monomer) i bierze udział przede wszystkim w neutralizacji nadtlenków lipidów i cholesterolu. Zidentyfikowano ją w gonadzie i najądrzu. Występuje w komórkach germinalnych nabłonka plemnikotwórczego i ostatecznie w plemnikach. Podkreśla się jej istotną rolę w spermatogenezie, szczególnie w jej końcowym etapie spermiogenezie, w którym ma miejsce dojrzewanie wydłużających się spermatyd. Wyróżnia się trzy izoformy tego enzymu: jądrową (nGPx4, nPHGPx, ang. *nuclear glutathione peroxidase*), mitochondrialną (mGPx4, mPHGPx, ang. *mitochondrial glutathione peroxidase*) i cytozolową (cGPx4, cPHGPx, ang. *cytosolic glutathione peroxidase*) (Barati i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2021; Juarez-Rojas i wsp., 2022; Liu i wsp., 2022; Łuczaj i Skrzydlewska, 2006; O'Flaherty i Scarlata, 2022; Puglisi i wsp., 2005; Takeshima i wsp., 2021; Walczak-Jędrzejowska i wsp., 2013).

Jądrowa PHGPx, specyficzna dla plemnika, uczestniczy w reorganizacji chromatyny plemników, wykorzystując  $H_2O_2$  do utlenienia grup -SH cysteiny występującej obficie w protaminach związanych z DNA plemników (pełni rolę peroksydazy białek). Utlenianie tych grup prowadzi do powstania mostków -S-S- wewnątrz protamin i pomiędzy nimi. Stabilizują one strukturę chromatyny i są niezbędnym procesem w jej kondensacji (Barati i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2021; Juarez-Rojas i wsp., 2022; Liu i wsp., 2022, Puglisi i wsp., 2005; Ritchie i wsp., 2020; Walczak-Jędrzejowska i wsp., 2013).

Mitochondrialna PHGPx i cytozolowa stanowią 50% białek zewnętrznej błony mitochondriów wstawki plemnika. W obecności zredukowanego glutationu PHGPx redukuje nadtlenki fosfolipidów, co chroni zewnętrzną błonę mitochondrialną przed działaniem RFT. Ponadto, PHGPx działając jako peroksydaza białek, przy udziale  $H_2O_2$  powoduje powstanie licznych poprzecznych wiązań -S-S- w białkach, co sprawia, że zewnętrzną błonę mitochondrialną staje się stabilna i oporna na działanie czynników zewnętrznych. W dojrzałych plemnikach PHGPx pełni rolę tylko strukturalną i jest nieaktywna (Puglisi i wsp., 2005; Piasecka i wsp., 2021).

#### S-transferaza glutationowa

Funkcję antyoksydacyjną posiada również S-transferaza glutationowa (GST, ang. *glutathione S-transferase*), występująca w formie trzech izoenzymów: cytozolowej, mitochondrialnej i mikrosomalnej. Enzymy te występują we wszystkich narządach ludzkiego organizmu i w przeciwieństwie do większości GPx nie zawierają selenu. Uczestniczą one w detoksykacji endo- i egzogennych związków elektrofilowych (RX) mających właściwości genotoksyczne i karcinogenne (np. ksenobiotyki) poprzez wiązanie z nimi GSH i usuwanie powstałych produktów (GSR) na zewnątrz komórki przy udziale transbłonowych białek (19). Ponadto, niektóre z nich mają aktywność peroksydazy glutationowej w stosunku do nadtlenków fosfolipidów (Barati i wsp., 2019; Dutta i wsp., 2021; Gałęcka i wsp., 2008; Gutowicz 2020; Llavanera i wsp., 2020; Marchewka i wsp., 2017, Marchlewicz i wsp., 2016; O'Flaherty i Scarlata, 2022; Sarniak i wsp., 2020; Sheweita i wsp., 2022; Williams i wsp., 2020).





### Peroksyredoksyny

Peroksyredoksyny (PRDX, ang. *peroxiredoxins*) należą do rodziny peroksydaz, mają zdolność redukcji  $H_2O_2$ , nie zawierają selenu. U ssaków wyróżnia się 6 izoform PRDX. PRDX1, 2, 6 to izoformy cytoplazmatyczne, PRDX4 zlokalizowana jest w siateczce śródplazmatycznej, PRDX3 w mitochondriach, a PRDX5 w różnych kompartmentach komórek somatycznych. Enzymy te występują powszechnie w układzie płciowym męskim. W gonadzie męskiej PRDX1 stwierdzono w spermatozoniach i okrągłych spermatydach, PRDX2 w okrągłych spermatydach, PRDX1, 4, 5, 6 w komórkach nabłonkowych przewodu najądrza. Peroksyredoksyny wykazano także w dojrzałych plemnikach (myszy, byka i człowieka). PRDX1–6 zlokalizowano w akrosomie, segmencie ekwatorialnym główki plemnika i jej części postakrosomalnej, ponadto w szyjce, wstawce, witce głównej plemnika, a także w jego resztkowej cytoplazmie (*Kumar i Singh, 2018; O'Flaherty i Scarlata, 2022; Shi i wsp., 2018*).

#### 1.3.3.2. Antyoksydanty nieenzymatyczne

Oprócz antyoksydantów enzymatycznych bardzo istotne są niskocząsteczkowe antyoksydanty nieenzymatyczne, które zwiększają aktywność wyżej wymienionych enzymów (**Tabela 3**).

#### Glutation

Związek ten jest tripeptydem, w skład którego wchodzi kwas glutaminowy, cysteina i glicyna. To najważniejszy nieenzymatyczny antyoksydant zwiększający ilość grup -SH w białkach. Reaguje z wolnymi rodnikami, z nadtlenkiem wodoru oraz z nadtlenkami organicznymi. Współdziała z GPx, GR i GST (**Rycina 3, 4**). Uczestniczy on w odtwarzaniu uszkodzonych makromolekuł komórek – białek, lipidów

błonowych i DNA. Jest on nie tylko, antyoksydantem, lecz również źródłem aminokwasów dla komórek germinalnych w trakcie spermatogenezy. Występuje w komórkach Sertolego, plemnikach i plazmie nasienia. Suplementacja glutationem może wpływać ochronnie na gruczoł krokowy, poprawiać jakość nasienia i zwiększać płodność (*Abdullah i wsp., 2021; Adeoye i wsp., 2018; Aitken i wsp., 2022; Barati i wsp., 2020; Dutta i wsp., 2022; Handy i wsp., 2022; Marchlewicz i wsp., 2016; Meseguer i wsp., 2007*).

#### Witamina C i E

Witamina C, kwas askorbinowy, należy do najważniejszych hydrofilowych antyoksydantów, jej stężenie w plazmie nasienia jest ponad 10-krotnie wyższe niż w surowicy, w roztworach wodnych występuje jako anion askorbinianowy. Z kolei witamina E ( $\alpha$ -tokoferol) jest silnym hydrofobowym przeciwutleniacz zlokalizowany głównie w błonach komórkowych. Obie witaminy uczestniczą w neutralizacji RFT, przez to chronią lipidy przed ich peroksydacją, jak również zabezpieczają nici DNA przed ich oksydacyjnym uszkodzeniem (*Ahmadi i wsp., 2016; Bălăceanu i wsp., 2022; Dutta i wsp., 2022; Majzoub i Agarwal 2018, Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Yamasaki i wsp., 2022*).

#### L-karnityna i L-acetylokarnityna

L-karnityna (LC,  $\beta$ -hydroksy- $\gamma$ -trimetyloamoniomaślan, ang. *L-carnitine*) i L-acetylokarnityna (ALC, ang. *acetyl-L-carnitine*), to dobrze rozpuszczalne w wodzie antyoksydanty. Ich stężenie w plazmie nasienia jest wprost proporcjonalne do koncentracji plemników w ejakulacie. Najwyższe stężenie LC występuje w najądrzu, jest ono 2000-krotnie wyższe niż we krwi, co związane jest z dojrzewaniem plemników w tym narządzie. Bowiem tutaj męskie

komórki rozrodcze zdobywają potencjalną zdolność do ruchu postępowego. Materiałem energetycznym są długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, których utlenianie ma miejsce w mitochondriach plemnika ( $\beta$ -oksydacja). Kwasy te z kompartmentu cytozolowego są przenoszone przez błony mitochondrialne do macierzy mitochondrialnej, za pomocą karnityny i kompleksu enzymów wbudowanych w błony mitochondrialne. Zarówno LC, jak i ALC, obok ich funkcji związanej z ruchliwością plemników, wykazują działanie przeciwutleniające, wychwyting bowiem aniony ponadtlenkowe i rodniki nadtlenu wodoru, hamując w ten sposób peroksydację lipidów. Istotnie niższe poziomy karnityny obserwowano w próbkach nasienia niepłodnych mężczyzn z oligoastenoteratozoospermią w porównaniu do grupy mężczyzn płodnych. W dostępnych metaanalizach potwierdzono, że suplementacja LC i ALC wykazuje znaczną poprawę wszystkich parametrów nasienia, zwłaszcza ruchliwości plemników (*Agarwal i wsp., 2019c; Ahmadi i wsp., 2016; Dutta i wsp., 2022; Majzoub i Agarwal, 2018; Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Walczak-Jędrzejowska 2015; Wei i wsp., 2021; Zhou i wsp., 2007*).

#### Koenzym Q10

Koenzym Q10, znany jako ubichinon, jest rozpuszczalnym w tłuszczach antyoksydantem. W komórkach uczestniczy w metabolizmie energetycznym, gdyż zlokalizowany jest w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i funkcjonuje jako jeden z przenośników elektronów w łańcuchu oddechowym, na poziomie którego ma miejsce tworzenie ATP (fosforylacja oksydacyjna). W formie zredukowanej wychwyting wolne rodniki, które generowane są przez łańcuch oddechowy. Stąd też zapobiega oksydacyjnym uszkodzeniom lipidów, białek i DNA. Jego stężenie w nasieniu

koreluje dodatnio z koncentracją, ruchliwością i morfologią plemników (*Agarwal i wsp., 2019c; Ahmadi i wsp., 2016; Dutta i wsp., 2022; Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Nadjarzadeh i wsp., 2014; Yamasaki i wsp., 2022*).

#### 1.3.3.3. Prostatomy

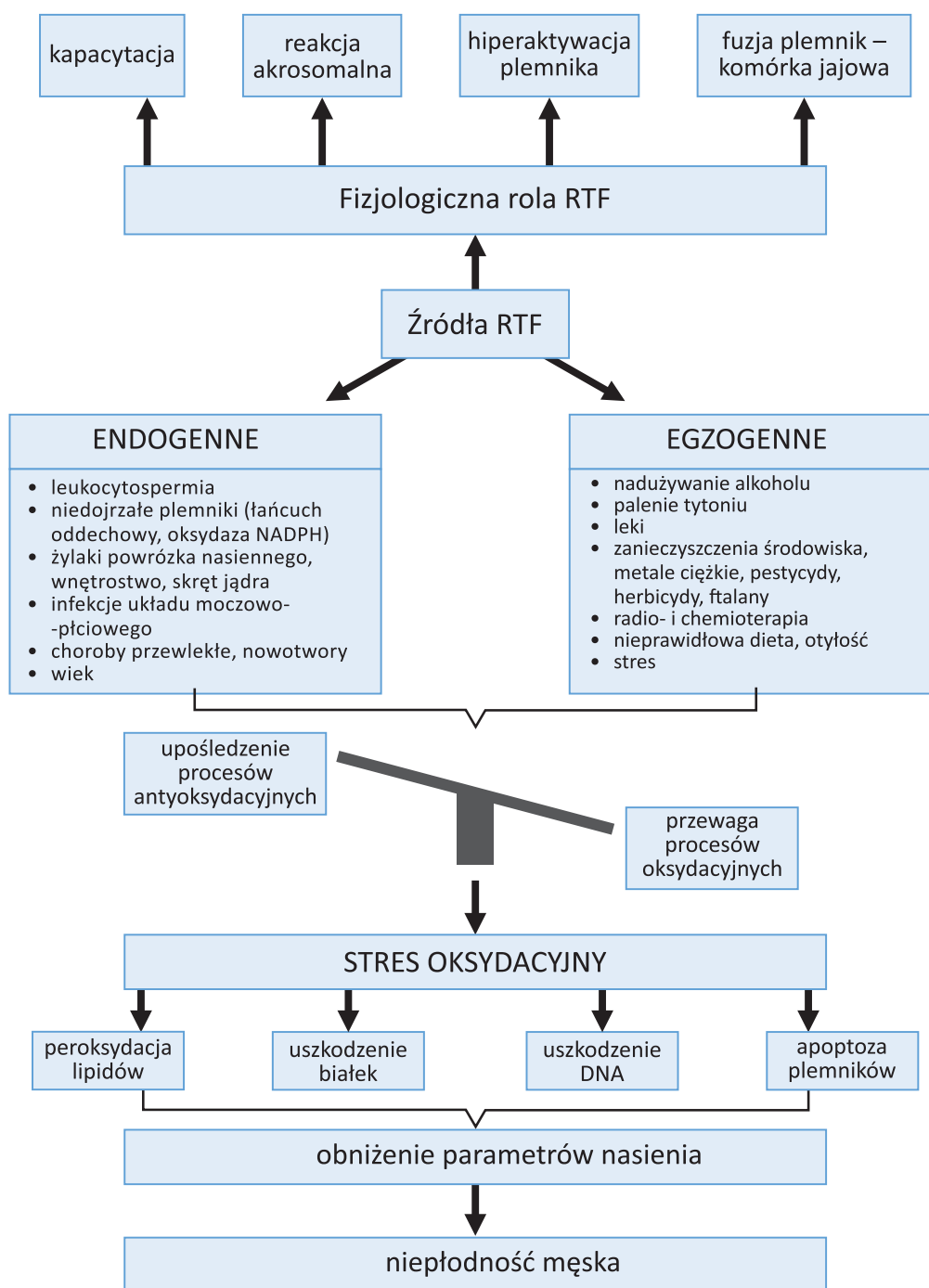
Istotną rolę w neutralizacji RFT pełnią prostatomy – pęcherzyki (30–500 nm) obficie występujące w plazmie nasienia, które mogą być nowym biomarkerem niepłodności męskiej. Uwalniane są przez komórki nabłonka gruczołowego prostaty. Wielowarstwowa błona prostatomów zawiera cholesterol i fosfolipidy w stosunku 2:1. Dominującym fosfolipidem jest sfingomielin. Pęcherzyki są źródłem wapnia, cholesterolu i wielu istotnych białek dla ochrony i funkcji plemnika. Tuż po ejakulacji, podczas procesu kapacytacji dochodzi do fuzji plemników z prostatomami (pochwa). Zarówno wapń i cholesterol z nich uwalniany wbudowywany jest w błonę komórkową męskich gamet, co chroni je przed przedwczesną kapacytacją i reakcją akrosomalną. W dalszych odcinkach dróg rodnych biorą udział w ochronie plemników, kontrolują ich ruch i procesy molekularne ich błony komórkowej. Ze względu na uwalniany z nich wapń regulują reakcję akrosomalną podczas procesu zapłodnienia. Pełnią funkcję immunomodulatoryjną i antybakteryjną, gdyż plemniki w żeńskich drogach rodnych narażone są na nieprawidłową florę bakteryjną i komórki zapalne, które są źródłem RFT. Antyoksydacyjna rola prostatomów, które nie wykazują aktywności SOD, wiąże się z obniżeniem zdolności leukocytów do generowania anionorodnika ponadtlenkowego, najprawdopodobniej poprzez zahamowanie aktywności ich oksydazy NADPH (*Baskaran i wsp., 2020; Frączek i wsp., 2005; Ronquist 2015; Vickram i wsp., 2020; 2022*).

### 1.3.4. Źródła reaktywnych form tlenu w nasieniu

#### 1.3.4.1. Endogenne źródła reaktywnych form tlenu w nasieniu

Najczęściej do endogennych komórkowych źródeł należą niedojrzałe plemniki i leukocyty, zwłaszcza neutrofile i makrofagi.

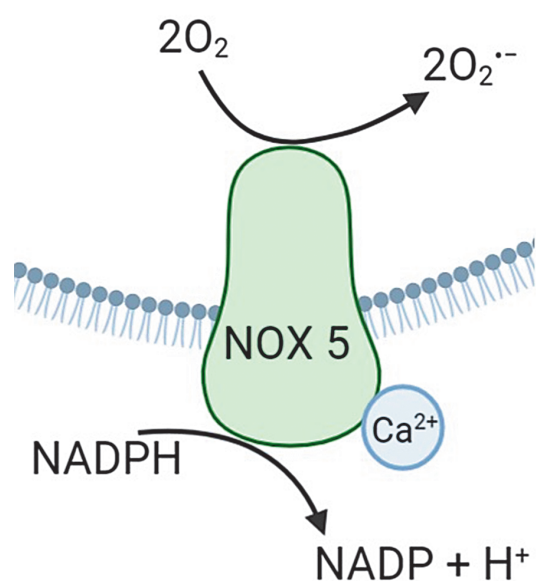
W plemnikach RFT powstają w resztkowej ich cytoplazmie, uszkodzonych mitochondriach i w wyniku aktywności oksydazy ksantynowej (**Rycina 5**) (*Agarwal i wsp., 2018c; Aitken, 2020; Aitken i Drevet, 2020; Azzi, 2022; Baskaran i wsp., 2021; Hardy i wsp., 2021; Takalani i wsp., 2023*).



Rycina 5. Przyczyny i konsekwencje stresu oksydacyjnego w układzie płciowym męskim. RFT – reaktywne formy tlenu

### Niedojrzałe formy plemników

Niedojrzałe formy męskich gamet powstają podczas nieprawidłowej spermatogenezy, szczególnie, gdy ma miejsce morfogeneza plemników (spermiogeneza), w której istotną jej częścią jest odrzucenie nadmiaru cytoplazmy. Zaburzenie tego procesu skutkuje obecnością resztkowej cytoplazmy zwłaszcza na poziomie szyjki i wstawki plemnika. RFT powstają dzięki aktywności błonowej oksydazy NADPH, obficie występującej w resztkowej cytoplazmie. Oksydaza ta jest kompleksem enzymatycznym zbudowanym z białek należących do rodziny NOX (ang. *NOX oxidase family*). W plemnikach identyfikuje się NOX5 zależną od jonów wapnia. Enzym ten redukuje  $O_2$  do  $O_2^{\cdot-}$ . Źródłem elektronów jest  $NADPH + H^+$ , który powstaje w cyklu heksosomonofosforanowym (HMP, ang. *hexose monophosphate shunt*) w wyniku utleniania glukozy-6-fosforanu do 6-fosfoglukonolaktonu. Reakcja katalizowana jest przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową (G6PDH, ang. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) (Rycina 5, 6) (Aitken, 2017b, 2020; Aitken i Drevet 2020; Aitken i wsp., 2022; Antony i wsp., 2017; Azzi, 2022; Baskaran i wsp., 2021; Brewer i wsp., 2013;



Rycina 6. Oksydaza NADPH i jej rola w plemniku

Dutta i wsp., 2019; Panday i wsp., 2015; Sarniak i wsp., 2016; Siddiqui i wsp., 2016; Takeshima i wsp., 2021; Walczak-Jędrzejowska, 2015).

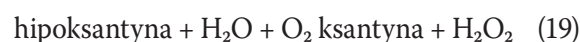
### Mitochondria

W sytuacji fizjologicznej w dojrzałych plemnikach pozbawionych znacznej części przestrzeni cytoplazmatycznej wytwarzanie RFT następuje przede wszystkim, jak w innych komórkach, w mitochondriach dzięki transportowi elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego zbudowanego z białek tworzących kompleksy enzymatyczne (I–IV) (wewnętrzna błona mitochondrialna). RFT, niezbędne do fizjologicznej aktywności plemnika oraz zapłodnienia, tworzone są zwłaszcza na poziomie kompleksu I i III, niekiedy kompleksu II. Generowany jest anionorodnik ponadtlenkowy, również rodnik hydroksylovowy, tlen singletowy oraz nadtlenuk wodoru. W przypadku uszkodzonego łańcucha oddechowego ma miejsce nadmiar wytwarzania RFT (wyciek elektronów z mitochondriów), które wtórnie uszkadzają mitochondrialny DNA, a przechodząc do cytoplazmy i dalej do jądra komórkowego powodują oksydacyjne zmiany w jądrowym DNA (Agarwal i wsp., 2018c; Aitken, 2020; Aitken i wsp., 2022; Azzi, 2022; Barati i wsp., 2019; Baskaran i wsp., 2021; Esteves, 2019; Evans i wsp., 2021; Mannucci i wsp., 2022; Mazat i wsp., 2020; Rana i Agarwal, 2021; Sies, 2020; Walczak-Jędrzejowska, 2015).

### Oksydaza ksantynowa

W plemnikach, jak i w plazmie nasienia, obecna jest oksydaza ksantynowa, która należy do dużych białek o masie cząsteczkowej 270 kDa, zawiera w swojej strukturze FAD oraz atomy molibdenu i żelaza (metaloflawoproteina). Bierze ona udział w metabolizmie zasad purynowych. Utlenianie ich przebiega dwustopniowo. Najpierw hipoksantyna przekształcana jest do ksantyny (19), następnie ksantyna

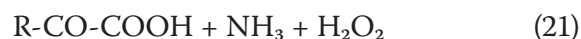
do kwasu moczowego (20). W reakcjach tych akceptorem elektronów jest  $O_2$ . Ulega on jedno- lub dwuelektronowej redukcji. Powstaje wówczas  $O_2^{\cdot -}$  lub  $H_2O_2$  w zależności od stężenia tlenu i pH środowiska (Aitken, 2017; 2020; Aitken i Drevet 2022; Antony i wsp., 2017; Azzi, 2022; Baskaran i wsp., 2021; Brewer i wsp., 2013; Dutta i wsp., 2019; Panday i wsp., 2015; Sarniak i wsp., 2016; Siddiqui i wsp., 2016; Takeshima i wsp., 2021; Walczak-Jędrzejowska, 2015).



### Oksydaza L-aminokwasów

Alternatywnym źródłem RFT w plemnikach ssaków może być oksydaza L-aminokwasów (flawoproteina), która po raz pierwszy została wykryta w plemnikach bydłowych. Zidentyfikowano ją w plemnikach konia, byka, knura, owcy i człowieka, u którego kodowana jest przez gen *IL4I1* (ang. *interleukin 4 induced 1*). Występuje w regionie akrosomalnym główki i we wstawce plemnika. Substratem dla tego enzymu są aminokwasy aromatyczne (tyrozyna, tryptofan, fenyloalanina). Oksydaza ta dokonuje oksydacyjnej deaminacji L-aminokwasów ( $R-CH(NH_2)-COOH$ ). W obecności tlenu powstaje  $H_2O_2$ , amoniak ( $NH_3$ ) i  $\alpha$ -ketokwasy ( $RCO-COOH$ ) (21). Sugeruje się, że oksydaza L-aminokwasów zaangażowana jest w ważne zjawiska molekularne jakie mają miejsce podczas kapacytacji plemników w żeńskich drogach rodnych, np. fosforylacja tyrozyn białek witki plemnika. Uważa się, że jest ona odpowiedzialna za regulację procesów oksydacyjno-redukcyjnych podczas kapacytacji. W badaniach eksperymentalnych *in vitro* wykazano, że jej stymulacja powoduje egzocytozę zawartości macierzy akrosomalnej niezależnie od obecności progesteronu. Powstały  $H_2O_2$ , dzięki aktywności oksydazy, jest czynnikiem niezbędnych

dla reakcji akrosomalnej, co w konsekwencji w warunkach naturalnej koncepcji umożliwia penetrację osłony przejrzystej oocytu podczas procesu zapłodnienia. Dlatego też oksydaza ta postrzegana jest jako biomarker plemników, na podstawie którego można dokonać selekcji męskich gamet o wysokiej jakości. Zatem może być ważnym wskaźnikiem męskiej płodności (Aitken i wsp., 2022; Aitken, 2017b, 2020; Houston i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2021).



### Lipooksygenaza

Enzym ten jest diooksygenazą zawierającą atomy żelaza. Powszechnie występuje w organizmach roślinnych i zwierzęcych (Baraniak i wsp., 2006). Identyfikowana jest również w cytoplazmie plemników ssaków. Jej aktywność zanika podczas transportu plemników przez najądrze, gdy ma miejsce „gubienie” kropli cytoplazmatycznej plemnika. Z kolei plemniki niedojrzałe zawierające resztkową cytoplazmę, posiadają nadmiar lipooksygenazy i kwasu arachidonowego (Yu i wsp., 2019). Enzym ten bierze udział w utlenianiu wolnych lub zestryfikowanych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (kwas linolowy, kwas dokozaheksaenowy), zwłaszcza arachidonowego (15-lipooksygenaza arachidonowa – ALOX15, ang. *arachidonate 15-lipoxygenase*), do ich wodoronadtlenków, które podlegają dalszej peroksydacji. Końcowym produktem tego procesu są toksyczne elektrofilowe aldehydy wchodzące w reakcje z białkami enzymatycznymi, w tym mitochondrialnego łańcucha oddechowego. W konsekwencji ma miejsce jego uszkodzenie i generowanie patologicznych ilości RFT. Tak więc plemnikowa ALOX15 przyczynia się do wzrostu RFT w nasieniu. Należy podkreślić, że zawartość tego enzymu w gametach męskich jest istotnie

większa w przypadku mężczyzn niepłodnych w porównaniu do mężczyzn z normozoospermia. Stwierdzono, że farmakologiczne zahamowanie ALOX15 chroni funkcjonalne kompetencje plemników do reakcji akrosomalnej oraz wiązania się plemnika z osłonką przejrzystą komórki jajowej (*Aitken i wsp., 2020; Azzi, 2022; Walters i wsp., 2021, 2018a,b*).

### Leukocyty

Do ważnych endogennych źródeł RFT w nasieniu należą leukocyty. Najczęściej występują granulocyty polimorfojądrowe (PMN, ang. *polymorphonuclear leukocytes*) stanowiące 50–60% wszystkich leukocytów, następnie makrofagi (20–30%) oraz limfocyty. W warunkach fizjologicznych leukocyty odgrywają kluczową rolę w nadzorze immunologicznym (neutralizacja patogenów) i usuwaniu nieprawidłowych plemników (fagocytoza, netoza). W ten sposób komórki te kontrolują jakość nasienia i zapobiegają przedostawaniu się uszkodzonych męskich gamet do żeńskiego układu rozrodczego (*Aitken i wsp., 2022; Barati i wsp., 2020; Takeshima i wsp., 2021; Ritchie i wsp., 2021; WHO 2021*).

Inną funkcją komórek zapalnych jest produkcja RFT (do 1000-krotnie więcej niż plemniki), które w warunkach fizjologicznych, w niewielkich ilościach, uczestniczą w ważnych procesach związanych z biologią plemnika i zapłodnieniem (**Rycina 5**) (patrz 1.3.5. Fizjologiczna rola RFT). Natomiast, gdy dochodzi do stanów zapalnych/infekcyjnych w układzie moczowo-płciowym ich liczba w nasieniu drastycznie wzrasta (leukocytospermia – koncentracja peroksydazo-dodatnich leukocytów  $\geq 1 \times 10^6/\text{mL}$ ), co wiąże się z generowaniem patologicznych ilości RFT. Aktywne leukocyty wytwarzają do 100-krotnie więcej RFT niż nieaktywne. Powstają one w wyniku „wybuchu tlenowego”. Dzięki aktywności oksydazy NADPH, także dysmutazy ponadtlenkowej

oraz mieloperoksydazy powstają zwiększone ilości RFT, takie jak  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , HOCl. Ponadto leukocyty po stymulacji przez patogeny uwalniają również cytokiny prozapalne (np. IL-6 i IL-8), proteazy (np. katepsyna G, kolagenaza i elastaza) oraz czynniki chemotaktyczne (*Aitken i wsp., 2022; Barati i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2022; Gill i wsp., 2022; Evans i wsp., 2021; Mannucci i wsp., 2022; Takeshima i wsp., 2021; Ritchie i wsp., 2021*).

### Inne

Do istotnych endogennych źródeł RFT należą żylaki powrózka nasiennego, wnętrostwo i skręt jądra. W przypadkach tych może dochodzić do stresu temperaturowego jąder, ich niedotlenienia, przekrwienia moszny oraz refluksu metabolitów w gonadzie, prowadzi to do zaburzenia równowagi między procesami pro- i antyoksydacyjnymi, co wiąże się z generowaniem nadmiaru RFT. Dodatkowo rośnie produkcja cytokin prozapalnych (np. IL-1, IL-18, IL-37) (**Rycina 5**) (*Barati i wsp., 2020; Cho i Agarwal, 2018; Finelli i wsp., 2022; Gill i wsp., 2021; Panner Selvam i wsp., 2021a; Ritchie i wsp., 2021; Tanaka i wsp., 2022*).

Do endogennych źródeł RFT należą również infekcje układu moczowo-płciowego. Zakażenie drobnoustrojami patogennymi (np. *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*) powodują uwolnienie dużych ilości RFT przez leukocyty (wybuch tlenowy) (**Rycina 5**). Wydzielane są ponadto cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$ ) modulujące równowagę oksydantów i antyoksydantów w przebiegu zapalenia. IL-1 zwiększa aktywność i przepuszczalność śródbłonna naczyń oraz aktywuje limfocyty; IL-6 odpowiada za regulację temperatury podczas stanu zapalnego; IL-8 działa jako czynnik chemotaktyczny neutrofilii; IL-10 obniża

odpowiedź zapalną poprzez blokowanie ekspresji komórek Th1; TNF- $\alpha$  zwiększa aktywność oraz przepuszczalność śródbłonna naczyń krwionośnych; a interferon gamma (IFN- $\gamma$ , ang. *interferon gamma*) odpowiada za aktywację makrofagów (Agarwal i wsp., 2018c; Barati i wsp., 2020; Dutta i wsp., 2019; Esteves i wsp., 2019; Evans i wsp., 2021; Frączek i Kurpisz 2015; Kumar i Singh, 2018; Rana i Agarwal, 2020; Walczak-Jędrzejowska, 2015).

#### 1.3.4.2. Egzogenne źródła reaktywnych form tlenu w nasieniu

Należy zwrócić również uwagę na bardzo istotne egzogenne źródła reaktywnych form tlenu (Rycina 5). Istotnym czynnikiem jest palenie tytoniu oraz zanieczyszczenia środowiska. Dym papierosowy zawiera olbrzymią ilość substancji toksycznych, mutagennych i rakotwórczych, a także różne stabilne i niestabilne RFT w fazie pyłowej i gazowej. Palenie prowadzi również do zwiększonej produkcji  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  oraz  $H_2O_2$ . Ponadto powoduje ono spadek kinazy kreatynowej plemników, enzymu niezbędnego do szybkiej regeneracji trifosforanu adenozy, który odgrywa ważną rolę w ruchliwości plemników, prowadząc tym samym do upośledzenia ruchliwości plemników (Agarwal i wsp., 2016d; 2018c; Barati i wsp., 2020; Dutta i wsp., 2021; Esteves i wsp., 2019; He i wsp., 2020). Palenie skutkuje również obniżeniem jakości nasienia, spadkiem aktywności akrozyny, upośledzoną przemianą histonów w protaminę, co prowadzi do niepłodności męskiej. Mężczyźni narażeni na papierosy, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, ftalany, promieniowanie jonizujące oraz pestycydy fosforoorganiczne wykazywali podwyższony poziom RFT i zwiększoną fragmentację DNA plemników. Dodatkowo udokumentowano szkodliwy wpływ zatrucia metalami ciężkimi – ołowiem, arsenem i kadmem, na ilość markerów stresu oksydacyjnego,

co również wiązało się ze spadkiem jakości nasienia (całkowita ruchliwość, ruch postępowy, morfologia plemników) (Agarwal i wsp., 2016d; 2018c; Dutta i wsp., 2019; 2021; Esteves i wsp., 2019; Evans i wsp., 2021; He i wsp., 2020; Kumar i Singh, 2018; Rana i Agarwal, 2020; Walczak-Jędrzejowska, 2015; Zargari i wsp., 2022; Zhou i wsp., 2016).

Podkreślić należy również rolę alkoholu, nieprawidłowej diety oraz otyłości, które są istotnym źródłem RFT. Stwierdzono, że nadmierne spożycie alkoholu jest związane zarówno ze słabą produkcją nasienia, jak i z jego gorszą jakością. Alkohol zwiększa aktywność cytochromu P450, który charakteryzuje się wysokim wskaźnikiem aktywności oksydazy NADPH, co prowadzi do zwiększonej produkcji RFT. Ponadto nadmierna podaż alkoholu często jest związana z niedożywieniem oraz dietą ubogą w antyoksydanty. Z kolei dieta bogata w węglowodany i tłuszcze może prowadzić do otyłości. Nadmiar tkanki tłuszczowej wydzielają cytokiny prozapalne i RFT. Otyłość powodować może przegrzanie jąder z powodu nagromadzenia tkanki tłuszczowej w okolicach pachwin, co wpływało na fragmentację DNA i w efekcie na płodność męską (Barati i wsp., 2019; Dutta i wsp., 2019, 2021; Esteves i wsp., 2019; Evans i wsp., 2021; Kumar i Singh, 2018; Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Nago i wsp., 2020; Walczak-Jędrzejowska, 2015; Zhao i wsp., 2016).

#### 1.3.5. Fizjologiczna rola RFT

Nie ulega wątpliwości, że fizjologiczna rola RFT dla funkcji plemnika, jego zdolności do zapłodnienia i pierwszych etapów rozwoju zarodka jest nie do przecenienia. Związki te odgrywają fundamentalną rolę w procesach biologicznych, gdyż uczestniczą m.in. w szlakach metabolicznych i sygnalizacyjnych, co niewątpliwie wiąże się w sposób bezpośredni i pośredni z ekspresją genów, która zależna jest od aktywności czynników transkrypcyjnych

i zmian epigenetycznych. Istotna rola RFT została wykazana w gonadzie męskiej, najądrzu i żeńskich drogach rodnych, gdy plemniki dostają się do nich podczas naturalnej koncepcji (**Rycina 5**) (*Aitken i Drevet, 2020; Baskaran i wsp., 2021; Dutta i wsp., 2022; 2019; Juarez-Rojas i wsp., 2022; Hardy i wsp., 2021; Hussain i wsp., 2023; Mancini i wsp., 2023; Otasevic i wsp., 2019; O'Flaherty i Scarlata, 2022; Takalani i wsp., 2023*).

### Gonada męska

W gonadzie męskiej, w nabłonku plemnikotwórczym RFT są niezbędne do proliferacji i różnicowania się komórek germinalnych podczas spermatogenezy, a także uczestniczą w procesie apoptozy tych komórek. Ponadto wykazuje się ich istotną rolę w procesie steroidogenezy, mającej miejsce w komórkach Leydiga. Uważa się, że RFT uczestniczą w odnowie komórek macierzystych nabłonka plemnikotwórczego, czyli spermatogonii. Są zatem odpowiedzialne za odpowiednią liczbę tych komórek, które dalej będą różnicowały się w spermatocyty, a te z kolei w plemniki. Wiadomym jest, że proces podziałów i różnicowania się spermatogonii jest procesem wymagającym wielu czynników, w tym hormonów, czynników wzrostu, transkrypcyjnych i niewielkich ilości RFT, które mogą być produkowane przez nieodróżnicowane spermatogonia i komórki Sertolego przy udziale wspomnianej już wcześniej oksydazy błonowej NOX. Stwierdza się bowiem, iż wyczerpanie RFT zmniejsza liczbę komórek macierzystych nabłonka plemnikotwórczego (*Baskaran i wsp., 2021; Hussain i wsp., 2023; Juarez-Rojas i wsp., 2022*).

### Najądrze

W przypadku najądrza RFT uczestniczą w najądrzowym dojrzewaniu plemników. Podczas transportu plemników przez przewód najądrza

ma miejsce utlenianie grup -SH cysteiny do mostków -S-S- w protaminach chromatyny plemnika, co w konsekwencji sprzyja dalszej jej kondensacji, stabilizacji i ochronie. W procesach tych uczestniczy GPx5 oraz PRDX6 wydzielane przez komórki nabłonkowe przewodu najądrza (**patrz 1.3.3.1. Antyoksydanty enzymatyczne**). Utleniania grup -SH i tworzenie -S-S- pomiędzy cząsteczkami protamin odbywa się w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uważa się również, że podczas transportu plemników przez najądrze GPx5 wbudowywana jest w błonę akrosomu, co zapobiega przedwczesnej reakcji akrosomalnej. Utlenianie grup -SH ma również miejsce w białkach witki plemnika najądrzowego, co związane jest z nabywaniem przez plemnik potencjalnej zdolności do ruchu postępowego. W procesie tym oprócz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uczestniczą również O<sub>2</sub><sup>•-</sup> oraz NO<sup>•</sup> (*Baskaran i wsp., 2021; Juarez-Rojas i wsp., 2022; Hussain i wsp., 2023; Otasevic i wsp., 2019; O'Flaherty i Scarlata, 2022*).

### Kapacytacja i hiperaktywacja plemników

Proces kapacytacji, czyli proces ostatecznego dojrzewania ejakulowanych plemników, odbywa się w żeńskich drogach rodnych. Bezpośrednio po ejakulacji plemniki, choć morfologicznie dojrzałe i ruchliwe, nie są w stanie zapłodnić komórki jajowej. Pełną zdolność do zapłodnienia osiągają w żeńskich drogach rodnych. Celem kapacytacji jest odsłonięcie receptorów plemnika dla komórki jajowej, co wiąże się z licznymi zmianami molekularnymi w ich błonie komórkowej i błonach akrosomu. Efektem kapacytacji jest także zmiana kinetyki męskich komórek rozrodczych, polegająca na ich hiperaktywacji. Umożliwia to dotarcie plemnikom do komórki jajowej i pokonanie barier jakie stwarza oocyt otoczony komórkami ziarnistymi wzgórką jajonośnego (*Aitken i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2021; Dutta i wsp., 2019; Hussain i wsp., 2023;*



*Juarez-Rojas i wsp., 2022; Otasevic i wsp., 2019, Piasecka i wsp., 2021).*

Molekularny mechanizm kapacytacji wiąże się z fosforylacją tyrozyn białek główki, wstawki i witki plemnika (fosforylowane są również trenonina i seryna). Nie ulega wątpliwości, że RFT ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i RFA ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) uczestniczą w wymienionych procesach. Są one bowiem aktywatorami szeregu enzymów, np. cykazy adenylanowej powodującej wzrost cyklicznego adenozyno-3'-5'-monosforanu (cAMP, ang. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*), kinazy A zależnej od cAMP (PKA, ang. *protein kinase A*), kinazy C zależnej od diacyloglicerolu (PKC, ang. *protein kinase C*), kinazy tyrozynowej (PTK, ang. *protein tyrosine kinase*), które w sposób pośredni lub bezpośredni uczestniczą w fosforylacji wymienionych białek, zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej plemnika, co związane jest z uwolnieniem z niej cholesterolu (aktywacja skramblazy) i otwarciu kanałów wapniowych powodujących wzrost stężenia wapnia w plemniku (np. kanałów CatSper uczestniczących w hiperaktywacji) (*Aitken i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2021; Dutta i wsp., 2019, 2022; Hussain i wsp., 2023; Juarez-Rojas i wsp., 2022; Otasevic i wsp., 2019, Piasecka i wsp., 2021; Zargari i wsp., 2022).*

#### **Zapłodnienie – reakcja akrosomalna, fuzja plemnika z komórką jajową**

Wyselekcjonowane plemniki, które poddały się procesowi kapacytacji po dotarciu do bańki jajowodu uczestniczą w procesie zapłodnienia. Są zdolne do przejścia przez pierwszą barierę, jaką są komórki ziarniste otaczające oocyt.

Te plemniki, które przedostały się przez warstwę komórek ziarnistych, w następnym etapie wiążą się z osłoną przejrzystą oocytu stanowiącą drugą barierę dla plemnika. Wiązanie się tych komórek z osłoną jest najsilniejszym stymulatorem reakcji akrosomalnej plemników, która następnie umożliwia im przedostanie się

przez tę barierę. Reakcja akrosomalna wiąże się z procesem egzocytozy, czyli wyrzucenia zawartości enzymów akrosomalnych, dzięki którym możliwa jest penetracja osłony przejrzystej i przedostanie się plemnika do przestrzeni żółtkowej. Jej molekularny mechanizm jest podobny do tego, jaki zachodzi podczas kapacytacji i zdecydowanie zależy od RFT ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i RFA ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), które są aktywatorami kluczowych enzymów, np. cykazy adenylanowej i fosfolipazy C. W efekcie aktywacji tych enzymów uruchamiane są kanały wapniowe, następuje wzrost wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$  i dochodzi do degradacji fosfolipidów zewnętrznej błony akrosomalnej, co w konsekwencji doprowadza do jej fuzji z błoną komórkową plemnika i ostatecznie procesu egzocytozy (**Rycina 5**) (*Agarwal i wsp., 2020a; Aitken i wsp., 2020; 2017; Baskaran i wsp., 2021; Dutta i wsp., 2019; 2022; Evans i wsp., 2021; Frączek i wsp., 2005; Kumar i Singh, 2018; Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Otasevic i wsp., 2019; Takalani i wsp., 2023).*

Plemnik, który pokonał osłonę przejrzystą i dostał się do przestrzeni żółtkowej ekwatorialną częścią swojej główki przylega do oolemy komórki jajowej. Ma miejsce fuzja obu błon: plemnika i oocytu. W tym procesie kluczowa jest obecność RFT, które jak wykazano, hamują aktywność białkowej fosfatazy tyrozynowej oraz aktywują kinazy i pomagają w zapobieganiu defosforylacji i dezaktywacji fosfolipazy A2 (PLA2, ang. *phospholipase A2*). Dzięki temu PLA2 może odszczepiać kwasy tłuszczowe (hydroliza) z błonowych glicerofosfolipidów w pozycji sn-2, czyli przy drugim atomie węgla glicerolu. Efektem tej reakcji enzymatycznej jest powstanie lizofosfolipidu i kwasu tłuszczowego, co w efekcie zwiększa płynność błony i nasila fuzję plemnika z oolemmą, która to fuzja jest krytycznym etapem zapłodnienia (*Aitken i wsp., 2020; Baskaran i wsp., 2021; Dutta i wsp., 2019; Evans*

*i wsp.*, 2021; Kumar i Singh, 2018; Otasevic i wsp., 2019; Zargari i wsp., 2022).

### Preimplantacyjny rozwój zarodka

Stwierdza się, że fizjologiczne ilości RFT jeszcze przed procesem implantacji zarodka ogrywają kluczową rolę w prawidłowym jego rozwoju poprzez modyfikację procesów redoks. Uczestniczą w tworzeniu się przedjądrzy, podziałów zygoty i blastomerów zarodka oraz zrzucenia osłony przejrzystej przez blastocystę przed jej implantacją do błony śluzowej macicy. Uważa się, że procesy te możliwe są dzięki temu, że RFT biorą udział w porozumiewaniu się komórek – sygnalizacji komórkowej i mogą regulować proces transkrypcji na poziomie czynników transkrypcyjnych (Ali i wsp., 2017; Deluao i wsp., 2022; Hardy i wsp., 2021).

Zrozumiałe jest zatem, że generowanie patologicznych ilości RFT pochodzących zarówno z komórki jajowej jak i plemnika lub z rozwijającego się zarodka, bądź też ze środowiska zewnętrznego (hodowanie zarodków w warunkach *in vitro* – media hodowlane, temperatura, stężenie tlenu, zabiegi na zarodku), zaburza rozwój i żywotność zarodka. Patomechanizm związany jest ze zwiększeniem uszkodzeń DNA, zmianą ekspresji genów, upośledzoną syntezą białek i tworzeniem się białek nieprawidłowo sfałdowanych. Ostatecznie w wyniku tych procesów dochodzi do braku implantacji, bądź też zaburzeń wzrastania płodu i niekorzystnego wpływu na zdrowie potomstwa (Ali i wsp., 2017; Deluao i wsp., 2022; Hardy i wsp., 2021; Luo i wsp., 2021).

### 1.3.6. Kliniczne konsekwencje stresu oksydacyjnego

#### Peroksydacja lipidów

Błona komórkowa plemników zawiera dużą ilość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acids*). Ta wysoka zawartość PUFA sprawia,

że plemniki są szczególnie podatne na proces nieenzymatycznej peroksydacji lipidów, bowiem RFT łatwo wchodzi w reakcje chemiczne z PUFA<sup>4</sup> lub jonami metali. Jest to wolnorodnikowy, wieloetapowy proces utleniania PUFA, który odbywa się w obecności tlenu. Wyróżnia się: inicjację, propagację i terminację. Bezpośrednimi produktami tego procesu są rodniki nadtlenkowe lipidów (LOO<sup>•</sup>), przekształcane do nierodnikowych produktów peroksydacji, czyli nadtlenków i wodoronadtlenków fosfolipidów. Reszty PUFA ulegają niekorzystnym przemianom ( $\beta$ -eliminacji), co prowadzi do ich rozpadu i powstania cytotoksycznych silnie elektrofilowych aldehydów, m.in. dialdehydu malonowego (MDA, ang. *malondialdehyde*), 4-hydroksynonenalu (4-HNE, ang. *4-hydroxynonenal*) i akroleiny (ang. *acrolein*). W efekcie rozpadu PUFA obniża się integralność błony komórkowej plemników, natomiast powstałe aldehydy wiążąc się z białkami plemnika nieodwracalnie je uszkadzając (patrz 1.3.6. Kliniczne uszkodzenie stresu oksydacyjnego). Wymienione aldehydy, głównie MDA, stanowią marker oksydacyjnego uszkodzenia lipidów (Rycina 5) (Aitken i wsp., 2022; Aitken, 2020; Barati i wsp., 2020; Dutta i wsp., 2019; Evans i wsp., 2021; Kumar i wsp., 2018; Martin-Hidalgo i wsp., 2019; Takeshima i wsp., 2021; Su i wsp., 2019; Walters i wsp., 2021; 2018; Wang i wsp., 2023).

#### Oksydacyjne uszkodzenie białek

Szczególnie na ataki RFT narażone są aminokwasy z pierścieniem aromatycznym (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina) lub heterocyklicznym (prolina), bądź też aminokwasy zasadowe (lizyna, histydyna, arginina), a także aminokwasy zawierające atomy siarki (S) (metionina) i grupy -SH (cysteina). Produktami utleniania grup -SH są rodniki tyłowe (RS<sup>•</sup>), które ulegają

<sup>4</sup> Atom wodoru zostaje oderwany od grupy metylenowej zlokalizowanej pomiędzy dwoma wiązaniami podwójnymi PUFA.

dimeryzacji, co w efekcie prowadzi do powstania mostków dwusiarczkowych (-S-S-). W efekcie działania RFT powstają nadtlutki aminokwasów i białek (*Aitken i wsp., 2022, Barati i wsp., 2020; Deluao, 2022; Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008*).

W konsekwencji RFT powodują nieodwracalną modyfikację aminokwasów i białek (**Rycina 5**). Ma miejsce zmiana struktury i konformacji białek, a także zwiększenie się ich agregacji. Ponadto obserwuje się denaturację białek, uszkodzenie wiązań polipeptydowych i powstanie wiązań poprzecznych. Należy podkreślić, że markerem uszkodzenia białek pod wpływem RFT jest poziom ich karbonylacji i nitracji tyrozyny. Toksyczne silne elektrofilowe aldehydy, które powstały w wyniku peroksydacji lipidów, np. 4-HNE, MDA, akroleina, zawierają grupę karbonylową (>C=O), dzięki czemu z łatwością wchodzi w reakcje z białkami i tworzą związki addycyjne. Jest to proces zaawansowanej lipooksydacji. Z kolei nitracja białek dotyczy włączenia grupy nitrowej (-NO<sub>2</sub>) do tyrozyny. Produktem tej reakcji jest 3-nitrotyrozyna. Nitracja możliwa jest w obecności RFA – nadtlutenoazotynu, który jest efektem reakcji tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlutlenkowym (*Aitken i wsp., 2022, Barati i wsp., 2020; Deluao, 2022*).

Należy podkreślić, że wymienione aldehydy wiążą się z różnymi białkami plemnika budującymi jego struktury, np. akrosom, centriole, mitochondria, błona komórkowa. Uszkodzenie białek struktur plemnika zmienia integralność jego błony komórkowej, upośledza transport i generowanie ATP przez mitochondria. W tym ostatnim przypadku wiązanie się wspomnianych aldehydów upośledza funkcję łańcucha oddechowego, co w konsekwencji zwiększa generowanie RFT przez mitochondria, które wtórnie będą uszkadzały mitochondrialne DNA, a wydostając się z tych organelli będą powodowały oksydacyjne uszkodzenie

jądrowego DNA (*Aitken i wsp., 2022, Barati i wsp., 2020; Deluao, 2022*).

#### Uszkodzenie DNA

RFT mogą oddziaływać zarówno z zasadami pirymidynowymi, jak i purynowymi w DNA komórek rozrodczych. Dochodzi do modyfikacji zasad azotowych i reszt cukrowych – deoksyrybozy. Związki te łączą się z węglem C5 i C6 w pierścieniu zasad pirymidynowych, z kolei w przypadku zasad purynowych wiążą się z węglem C4, C5, C6 i C8. Najczęstszym produktem oksydacji DNA jest 8-hydroksyguanina (może tworzyć się również 8-hydroksyadenina), która powstaje w wyniku reakcji OH<sup>\*</sup> lub tlenu singletowego z C8 guaniny. W efekcie oksydacyjnego uszkodzenia guaniny, związanej z deoksyrybozą wiązaniem N-glikozydowym, powstaje 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG, ang. *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*), będąca markerem oksydacyjnego uszkodzenia DNA (addukt DNA) (**Rycina 5**) (*Aitken, 2017a,b; Aitken i wsp., 2022; Barati i wsp., 2020; Bibov i wsp., 2018; Deluao i wsp., 2022; Evans i wsp., 2021; Farkouh i wsp., 2022; Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008; Rashki Ghaleno i wsp., 2021; Takeshima i wsp., 2021*).

Powstałe uszkodzenia mogą prowadzić do mutacji i obniżenia integralności DNA. 8-OHdG jest przyczyną spontanicznej i dziedzicznej mutacji (SNV, ang. *single nucleotide variants mutations*), bowiem guanina (G) zostaje zamieniona na tyminę (T). Taka sytuacja podczas replikacji prowadzi do transwersji GC→TA. Ponadto zmodyfikowana oksydacyjnie guanina staje się przyczyną powstania pojedynczych nacięć DNA w wyniku niekompletnej naprawy uszkodzeń materiału genetycznego w dojrzałym plemniku (*Agarwal i wsp., 2020a; Garcia-Rodriguez i wsp., 2019; Poetsch i wsp., 2020*). System komórkowej naprawy jest w stanie wykryć i całkowicie usunąć wymienione nieprawidłowości w przypadku komórek

somatycznych i wysoce zróżnicowanych komórek germinalnych (okrągłe i wydłużone spermatozoidy). Natomiast w przypadku męskich komórek rozrodczych naprawa ta niekoniecznie jest efektywna, bowiem plemnik nie dysponuje pełnym zestawem enzymów uczestniczących w tej naprawie. W takiej sytuacji korzysta on z kompetencji komórki jajowej, która ma zdolność usuwania uszkodzeń jego DNA. Addukt 8-OHdG zostaje usuwany za pomocą systemu naprawy typu BER (ang. *base excision repair*), czyli wycinania zmodyfikowanych zasad. Należy jednak zaznaczyć, że plemniki posiadają tylko jeden z niezbędnych enzymów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA. Enzym ten to glikozylaza 1 8-oksoguaniny (OGG1, ang. *8-oxoguanine DNA glycosylase*), mająca o wiele wyższą aktywność w plemniku niż w oocyte. Przecina ona wiązanie N-glikozydowe pomiędzy uszkodzoną zasadą a deoksyrybozą. W ten sposób powstaje niestabilne/wrażliwe miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP, ang. *apurinic site*) rozpoznawane przez AP-endonukleazę 1 (tnie łańcuch DNA pozostawiając wolny koniec 3'OH), ale tylko w komórkach somatycznych i oocyte. W męskich gametach nie stwierdza się tego enzymu. W takiej sytuacji niestabilne miejsce AP w DNA plemnika jest nacinane w sposób nieenzymatyczny (np. wysoka temperatura, warunki alkaliczne, poliaminy), co powoduje powstanie pojedynczych nacięć DNA plemnika (Aitken i wsp., 2023; Aitken, 2022; Barati i wsp., 2020; Champroux i wsp., 2016; Deluao i wsp., 2022; Evans i wsp., 2021; Farkouh i wsp., 2022; Gavriliouk i Aitken, 2015; Gunes i wsp., 2015; Newman i wsp., 2022; Poetsch, 2020; Rashki Ghaleño i wsp., 2021).

Proces naprawy oksydacyjnego uszkodzenia DNA kontynuowany jest w komórce jajowej po wnikięciu do niej plemnika, po dekondensacji i przed replikacją jego materiału genetycznego na poziomie przedjądra męskiego (przed fazą S pierwszego podziału mitotycznego

zygoty). Deoksyrybofosfodiesteraza usuwa deoksyrybozę. Enzym ten może mieć aktywność polimerazy DNA i wraz z ligazą, łączącą wolne końce fragmentów DNA uczestniczy w uzupełnieniu brakującego fragmentu DNA (Champroux i wsp., 2016; Deluao i wsp., 2022; Gavriliouk i Aitken, 2015; Gunes i wsp., 2015; Poetsch, 2020; Takeshima i wsp., 2021).

Nie można pominąć faktu, że RFT stają się przyczyną powstania podwójnych nacięć DNA, bowiem powstałe w wyniku peroksydacji lipidów błonowych produkty (m.in. MDA, 4-HNE) mają zdolność do aktywacji endonukleaz i kaspaz, co sprzyja podwójnemu nacięciu nici DNA (patrz 1.3.6. Kliniczne konsekwencje stresu oksydacyjnego). Wynika z tego, że RFT w sposób bezpośredni powodują pojedyncze nacięcia nici DNA, natomiast pośrednio przyczyniają się do podwójnych nacięć nici DNA (Agarwal i wsp., 2020a).

Obecnie wiadomo, że nienaprawione oksydacyjne uszkodzenie DNA plemnika stają się przyczyną zaburzeń zapłodnienia i niepowodzeń w uzyskaniu ciąży, zarówno w warunkach naturalnej koncepcji jak i wspomaganej medycznie. Ponieważ prowadzą do powstania mutacji i mogą zaburzać replikację i transkrypcję już we wczesnych etapach rozwoju zarodka stają się przyczyną zahamowania podziałów blastomerów zarodka i ich apoptozy. W takiej sytuacji może dochodzić do zaburzeń implantacji, bądź też wczesnych poronień. Natomiast gdy nienaprawione uszkodzenia DNA są tolerowane przez rozwijający się zarodek mogą skutkować zaburzeniami organogenezy i predyspozycjami do pojawienia się nowotworów u potomstwa, chorób genetycznych czy zaburzeń metabolicznych, a także zmian epigenetycznych (Agarwal i wsp., 2020a, b; Aitken i Bakos, 2021; Champroux i wsp., 2016; Farkouh i wsp., 2022; Garcia-Rodriguez i wsp., 2018; Gavriliouk i Aitken, 2015; Gunes i wsp., 2015; Newman i wsp., 2022).

## 2. UZASADNIENIE I CEL BADAŃ

Ponieważ standardowa ocena seminologiczna ma pewne ograniczenia w ocenie zdolności plemników do zapłodnienia, niezbędnym wydaje się wprowadzenie rozszerzonej i zaawansowanej oceny parametrów seminologicznych, na co zwróciło uwagę wielu autorów, w tym eksperci 6. wydania *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (Agarwal i wsp., 2019c; Aitken i Lewis, 2023; Björndahl i wsp., 2023; Boitrelle i wsp., 2021; Calogero i wsp., 2023; Dai i wsp., 2021; Elbardisi i wsp., 2020; Majzoub i wsp., 2018, 2019; Panner Selvam i wsp., 2021b; Panner Selvam i Agarwal, 2018; WHO 2021; Walczak-Jędrzejowska, 2022). Dodatkowa diagnostyka jest szczególnie uzasadniona ze względu na niepłodność idiopatyczną (30–50% przypadków), w której standardowe parametry plemników są nieprawidłowe, bądź niewyjaśnioną (15–40%), w której stwierdza się prawidłowe parametry plemników, o czym wspomniano już we *Wprowadzeniu* (Agarwal i wsp., 2019c, 2021; Boeri i wsp., 2022; Björndahl i wsp., 2023; Cicek i wsp., 2021; Corsini i wsp., 2023; Hamada i wsp., 2011, 2012; Ritchie i Ko, 2021; Wang i wsp., 2023), biorąc pod uwagę dolne wartości referencyjne proponowane przez 5. wydanie *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* z 2010 r. (WHO, 2010). Wynika z tego, że normozoospermia nie może być synonimem płodności. W wymienionych przypadkach należy spodziewać się zaburzeń molekularnych plemników wymagających wspomnianych dodatkowych metod diagnostycznych, często niedostępnych dla wielu pracowni andrologicznych, ze względu na koszty i brak specjalistycznego sprzętu oraz wykwalifikowanego personelu.

Wśród markerów niepłodności męskiej, które miałyby odpowiednią wartość progno-

styczną i użyteczność kliniczną proponuje się status chromatyny plemników oraz potencjał oksydacyjno–redukcyjny nasienia (ORP, ang. *oxidation–reduction potential*) wyrażany jako sORP (ang. *static ORP*) i mierzony za pomocą niedawno wprowadzonego systemu MiOXSYS® (ang. *Male Infertility Oxidative System*) (Agarwal i wsp., 2018b; 2022; Azzi, 2022; Humaidan i wsp., 2022; Majzoub i wsp., 2018, 2019; Martins i Agarwal, 2019; Panner Selvam i wsp., 2021a,b, 2022; Vassiliou i wsp., 2020), bowiem liczne doniesienia potwierdzają kluczowe znaczenie prawidłowego statusu chromatyny plemników dla procesu zapłodnienia, rozwoju zarodka, uzyskania ciąży w warunkach fizjologicznych oraz w procedurach wspomaganego rozrodu, a także dla zdrowia potomstwa (Agarwal i wsp., 2016 c, d; 2019c, 2022, 2023; Calogero i wsp., 2023; Cho i Agarwal, 2018; Esteves i wsp., 2021; Farkouh i wsp., 2022; Humaidan i wsp., 2022; Jerre i wsp., 2019; Majzoub i wsp., 2019; McQueen i wsp., 2019; Panner Selvam i wsp., 2021b; Watanabe, 2022; Zheng i wsp., 2018), jak również niekorzystny wpływ stresu oksydacyjnego (przewaga procesów oksydacyjnych nad redukcyjnymi przy niewydolności antyoksydacyjnej) w układzie płciowym męskim, w tym nasieniu na wymienione procesy i zjawiska (Agarwal i wsp., 2016b, e, 2017c, 2018c, 2019a, b; 2023; Agarwal i Wang 2017; Agarwal i Bui, 2017; Arafa i wsp., 2018; Azzi, 2022; Alfaro Gomez i wsp., 2023; Humaidan i wsp., 2022; Majzoub i wsp., 2018; Panner Selvam i wsp., 2021b, 2022; Takalani i wsp., 2023; Watanabe, 2022; Zaha i wsp., 2023).

Obydwa wymienione biomarkery mogą być ze sobą powiązane, gdyż stres oksydacyjny jest znanym i obecnie powszechnym czynnikiem etiologicznym obniżenia integralności genomu plemników. Co więcej, czynniki wywołujące zarówno fragmentację DNA (SDF, ang. *sperm*

DNA fragmentation), jak i stres oksydacyjny niejednokrotnie są tożsame (*Agarwal i wsp.*, 2016a, 2018c, 2019a, 2023; *Agarwal i Bui*, 2017; *Aitken i wsp.*, 2022, 2023; *Bui i wsp.*, 2018; *Dutta i wsp.*, 2019, 2021; *Farkouh i wsp.*, 2022; *Mancini i wsp.*, 2023; *Takalani i wsp.*, 2023). Ponadto, o czym wspomniano już we *Wprowadzeniu* 80% niepłodności idiopatycznej może być związane ze stresem oksydacyjnym (MOSI) w nasieniu (*Agarwal i wsp.*, 2019c; *Castleton i wsp.*, 2022; *Alfaro Gomez i wsp.*, 2023).

Obecnie proponuje się, że 20% plemników w ejakulacie z pofragmentowanym DNA jest wartością graniczną odróżniającą mężczyzn płodnych od niepłodnych (*Agarwal i wsp.*, 2022; *Esteves i wsp.*, 2021; *Farkouh i wsp.*, 2022; *Panner Selvam i wsp.*, 2021a; *Santi i wsp.*, 2018). Z kolei, za stres oksydacyjny uznaje się wartość sORP  $>1,37 \text{ mV}/\times 10^6$  plemników/mL (*Agarwal i wsp.*, 2018b).

**Celem ogólnym** w niniejszej dysertacji było znalezienie związku między konwencjonalną charakterystyką nasienia, integralnością

genomu plemników, potencjałem oksydacyjno–redukcyjnym w nasieniu, konwencjonalną ich charakterystyką a niepłodnością męską.

**Cele szczegółowe** były następujące:

- ▶ Porównanie konwencjonalnej charakterystyki nasienia, wartości SDF i sORP w nasieniu między mężczyznami niepłodnymi i płodnymi,
- ▶ Wyłonienie grup badanych mężczyzn z SDF  $>20\%$  i z sORP  $>1,37 \text{ mV}/\times 10^6$  plemników/mL w grupie mężczyzn niepłodnych i płodnych oraz porównanie częstości ich występowania,
- ▶ Oszacowanie ryzyka na wystąpienie SDF  $>20\%$  i sORP  $>1,37 \text{ mV}/\times 10^6$  plemników/mL w grupie mężczyzn niepłodnych i płodnych,
- ▶ Ustalenie wartości predykcyjnej testów weryfikujących SDF i sORP w nasieniu dla odróżnienia mężczyzn niepłodnych od płodnych (poszukiwanie takiej wartości granicznej SDF i sORP, powyżej której zwiększa się ryzyko niepłodności męskiej).

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Pacjenci

Badania wykonane zostały na nasieniu mężczyzn, którzy jako ochotnicy zgłaszali się do Pracowni Andrologicznej Zakładu Histologii i Biologii Rozwoju Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM). Grupę kontrolną ( $n = 89$ ) stanowili mężczyźni płodni – ojcowie dzieci rodzących się w Klinice Perinatologii, Położnictwa i Ginekologii PUM w Policach, którzy w okresie ostatnich 2 lat zostali rodzicami. Natomiast grupę badaną ( $n = 117$ ) stanowili mężczyźni, u których stwierdzono niepłodność (brak uzyskania ciąży w ciągu co najmniej 12 miesięcy regularnego współżycia z partnerką w celach koncepcyjnych). Byli oni kwalifikowani przez lekarzy specjalistów (urologów, ginekologów) i kierowani do Pracowni Andrologicznej w celu oceny parametrów nasienia w ramach niniejszego projektu. Wykluczeni z badania zostali mężczyźni ze zdiagnozowanymi wcześniej zylakami powrózka nasiennego, skrętem jąder, wnetrostwem, azoospermią, onkologiczni po przebytej chemioterapii i radioterapii. Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej PUM (uchwała nr KB-0012/186/19 z dnia 02.12.2019 r.). Materiał do badań zbierano w latach 2021–2023<sup>5</sup>.

Wszyscy mężczyźni wypełnili niezbędne zgody, ankiety dotyczące wywiadu medycznego (przebyte i/lub aktualne choroby, farmakoterapia, radioterapii, chemioterapii, interwencji zabiegowych, infekcji układu moczowo-płciowego, nawyków żywieniowych, używek) i wywiadu rodzinnego.

Na podstawie standardowej oceny seminologicznej wykonanej wg rekomendacji WHO (*WHO, 2021; Walczak-Jędrzejowska, 2022; Björndahl i wsp., 2023*), biorąc pod uwagę wartości 5. centyla obliczone przez panel ekspertów

*WHO, 2021* dla liczby, morfologii i ruchu postępowego plemników mężczyzn płodnych, wśród mężczyzn płodnych uwzględnionych w niniejszej dysertacji, stwierdzono 46 z normozoospermią (N; liczba plemników w ejakulacie  $\geq 5$ . centyla –  $\geq 39 \times 10^6$ /ejakulat, odsetek plemników z ruchem postępowym  $\geq 5$ . centyla –  $\geq 30$ , odsetek plemników morfologicznie prawidłowych  $\geq 5$ . centyla –  $\geq 4$ ). Ponadto w tej grupie było 34 z teratozoospermią (T, odsetek plemników morfologicznie prawidłowych  $< 4$ ), 5 z oligozoospermią (O, liczba plemników w ejakulacie  $< 39 \times 10^6$ /ejakulat), 2 z oligoterozoospermią (OT), 1 z astenozoospermią (A, odsetek plemników z ruchem postępowym  $< 30$ ) i 1 z astenoterozoospermią (AT). Z kolei w grupie mężczyzn niepłodnych wykazano 33 z T, 29 z oligoastenoterozoospermią (OAT), 22 z OT, 22 z AT, 10 z N oraz 1 z O.

#### 3.2. Analiza seminologiczna, WHO, 2021

Próbki nasienia uzyskane zostały przez masturbację do sterylnego plastikowego pojemnika, okres abstynencji seksualnej wynosił 2–7 dni. Podstawowa analiza nasienia obejmowała ocenę:

- makroskopową: objętość ejakulatu, upłynnienie (prawidłowy czas upłynnienia to 30–60 minut w temperaturze 37°C), wygląd/kolor, zapach, pH, lepkość;
- mikroskopową: koncentrację plemników ( $\times 10^6$ /mL) całkowitą ich liczbę w ejakulacie ( $\times 10^6$ /ejakulat) (udoskonalona komora Neubauera, Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Niemcy), ich ruchliwość (ruch postępowy, niepostępowy, całkowity [postępowy + niepostępowy], brak ruchu), żywotność (komórki eozyno-negatywne oraz HOS-test pozytywne), morfologię, indeks teratozoospermii (TZI, ang. *teratozoospermia index*, odzwierciedlający średnią liczbę defektów strukturalnych główki,

<sup>5</sup> W 2020 r. i częściowo w 2021 r. zbieranie materiału było ograniczone ze względu na obostrzenia epidemiologiczne.

wstawki i witki plemnika oraz średnią liczbę plemników z nadmiarem resztkowej cytoplazmy przypadających na jeden nieprawidłowy plemnik), a także liczbę komórek linii spermatogenicznej ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) oraz komórek zapalnych (komórki peroksydazododatnie, Endtz test, LeucoScreen kit, FertiPro N.V., Beernem, Belgium).

Do oceny nasienia wykorzystano mikroskop kontrastowo-fazowy (400 $\times$ ) (Leica, DM500 RH, Heerbrugg, Szwajcaria) i mikroskop świetlny (1000 $\times$ ) (CX 31 Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japonia). W tym ostatnim dokonano oceny morfologicznej plemników na podstawie rozmazu natywnego nasienia, barwionego metodą Papanicolau, stosując ściśle kryteria Krugera (*WHO, 2021; Walczak-Jędrzejowska, 2022*).

### 3.3. Test dyspersji chromatyny plemnika (SCD) – rozszerzona analiza nasienia

Ocena fragmentacji plemnikowego DNA (SDF) została wykonana przy użyciu testu dyspersji chromatyny (SCD, ang. *sperm chromatin dispersion*), za pomocą komercyjnego zestawu Halosperm<sup>®</sup> G2 (Halotech DNA, Madrid, Spain). Test przeprowadzony został zgodnie z instrukcją producenta:

- Rozpuszczono agarozę w 95–100°C przez 5 minut lub do całkowitego jej rozpuszczenia, następnie podzielono agarozę do 10 probówek Eppendorf (100  $\mu\text{L}$  każda), utrzymano temperaturę 37°C przez następne 5 minut, aby zapobiec żelowaniu,
- W razie konieczności rozcieńczono próbkę nasienia do maksymalnej koncentracji 20 milionów plemników/mL,
- Dodano 50  $\mu\text{L}$  próbki nasienia do próbki typu Eppendorf z uprzednio przygotowaną agarozą (37°C) i delikatnie wymieszano mikropipetą,
- Naniesiono kroplę 8  $\mu\text{L}$  próbki na środek szkiełka podstawowego i przykryto szkiełkiem nakrywkowym,

- Szkiełko umieszczono w lodówce w temperaturze 4°C na 5 minut celem związania plemników z agarozą, następnie szkiełko wyjęto z lodówki i zdjęto szkiełko nakrywkowe, kolejne procesy wykonywano w temperaturze pokojowej (22°C),
- W późniejszym etapie za pomocą kwasu solnego dokonano kwaśnej denaturacji w celu zniszczenia mostków wodorowych (7 minut),
- Za pomocą ditiotreitolu i związku trytonu X-100 dokonano lizy błon i proteolizy białek (20 min),
- Przepłukano szkiełko wodą destylowaną przez 5 minut,
- Umieszczono szkiełko kolejno w roztworze 70% etanolu (2 minuty), a następnie w etanolu absolutnym (2 minuty) i pozostawiono do wyschnięcia,
- W dalszym etapie przeprowadzono barwienie preparatu kolejno eozyną (7 minut) oraz tiazyną (7 minut),
- Ocena halo wokół główki plemnika pod mikroskopem świetlnym (1000 $\times$ , Leica, DM500 RH, Heerbrugg, Szwajcaria). Oceniano 500 plemników każdego badanego.

Plemnik z integralnym DNA jest zdolny do generowania dużych pętli DNA (tzw. *halo*) układających się wokół jego główki. Jako wynik pozytywny (brak fragmentacji DNA) uznaje się *halo* o średnicy  $>1/3$  średnicy główki (średnie *halo*) i o średnicy większej niż średnica główki plemnika (duże *halo*). Z kolei wynik negatywny (obecność nacięć DNA) uznaje się, gdy *halo* jest  $\leq 1/3$  średnicy główki plemnika (małe *halo*) lub brak jest *halo*. Plemniki z niewybarwioną główką to komórki ze zdegradowanym DNA. Ostatecznie, odsetek plemników nieprawidłowych prezentuje liczbę plemników z pofragmentowanym i zdegradowanym DNA (*Cissen i wsp., 2016; Elbardisi i wsp., 2020; Gill i wsp., 2022; Kuroda i wsp.,*



2023). Według producenta testu Halosperm® G2 wynik prawidłowy to wartość  $SDF \leq 30\%$ .

#### 3.4. Test weryfikujący potencjał oksydacyjno-redukcyjny w nasieniu – zaawansowana analiza nasienia

Ocena potencjału oksydacyjno–redukcyjnego (ORP) nasienia przeprowadzona została z wykorzystaniem elektrochemicznego systemu MiOXSYS® (Aytu BioScience Inc, Englewood, Colorado, USA). W skład tego systemu wchodzi analizator MiOXSYS® i jednorazowy sensor. Zgodnie z instrukcją producenta 30  $\mu$ L upłynnionego nasienia zostało naniesione na odpowiednie pole sensora, który następnie został umieszczony w analizatorze. Po upływie 4 minut odczytano wynik ORP (Agarwal i wsp., 2016e; 2018b, Agarwal i Bui, 2017; Castleton i wsp., 2022; Karabulut i wsp., 2021).

Test ten w sposób bezpośredni, na podstawie transferu elektronów z reduktantów (antyoksydantów) na oksydanty, mierzy istniejącą równowagę pomiędzy nimi w układach biologicznych. Wynik ORP (tzw. „surowy”) wyraża się w mV. Wartość ORP podawana jest jako wartość znormalizowana, po przeliczeniu jej na koncentrację plemników w próbce nasienia. Ostatecznie znormalizowany wynik sORP podawany jest w  $mV/10^6$  plemników/mL nasienia. Jako wynik prawidłowy uznaje się wartość  $sORP \leq 1,37$ , która wskazuje na równowagę między procesami utleniania i redukcji. Natomiast wartość  $sORP > 1,37$  odzwierciedla brak równowagi między tymi procesami, z przewagą reakcji utleniania (stres oksydacyjny) (Agarwal i wsp., 2016e, 2018b, 2019a; Agarwal i Wang, 2017; Castleton i wsp., 2022; Karabulut i wsp., 2021; Nago i wsp., 2021, Vassiliou i wsp., 2021).

#### 3.5. Analiza statystyczna

Do kalkulacji statystycznych wykorzystano oprogramowanie komputerowe Statistica

wersja 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska) oraz MedCalc wersja 13.0.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgia). Statystyka opisowa zmiennych ilościowych uwzględniała mediany wraz z zakresami oraz średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe (SD, ang. *standard deviation*). Ponieważ test Shapiro–Wilka, wykluczył zgodność rozkładu badanych zmiennych z rozkładem normalnym (przyjmując zgodność na poziomie istotności  $p \geq 0,05$ ), do porównania uzyskanych danych zastosowano test U Manna–Whitneya (rangowy test nieparametryczny, którego wartością centralną są mediany). Porównaniu podlegały również dane jakościowe uwzględniające cechy takie jak: istotny klinicznie stopień fragmentacji jądrowego DNA plemników ( $SDF > 20\%$ ) oraz stres oksydacyjny w nasieniu ( $sORP > 1,37$ ), które zostały zaprezentowane w postaci procentowego rozkładu mężczyzn w każdej z badanych grup (rozpowszechnienie badanej cechy w populacji). Istotność różnic w tych odsetkach zweryfikowano stosując test  $\chi^2$ . Do określenia wielokrotności ryzyka na wystąpienie  $SDF > 20\%$  i  $sORP > 1,37$ , w grupie mężczyzn niepełnych w odniesieniu do grupy mężczyzn z potwierdzoną płodnością, zastosowano analizę ilorazu szans (OR, ang. *odds ratio*) – dane zaprezentowano z uwzględnieniem OR i 95% przedziału ufności (95% CI, ang. *95% confidence interval*). Zgodnie z sugestią WHO z 2021, podjęto się także określenia wewnątrzlaboratoryjnej wartości granicznej testów weryfikujących SDF oraz sORP w celu określenia takiej wartości, która najlepiej odróżniałaby mężczyzn niepełnych od płodnych (optymalny punkt odcięcia). W tym celu zastosowano analizę krzywej ROC (ang. *receiver operating characteristic*), mierząc pole powierzchni pod krzywą (AUC, ang. *area under curve*) z uwzględnieniem błędu standardowego (SE, ang. *standard error*) i 95% CI,

czułości oraz specyficzności testu statystycznego<sup>6</sup>. Wartości AUC interpretowano w następujący sposób: >0,9–1,0 – doskonała wartość predykcyjna, >0,8–0,9 – dobra wartość predykcyjna, >0,7–0,8 – satysfakcjonująca

wartość predykcyjna, >0,6–0,7 – średnia wartość predykcyjna, 0,5–0,6 – niewystarczająca wartość predykcyjna. Poziom statystycznej istotności wszystkich testów przyjęto przy  $p < 0,05$ .

---

<sup>6</sup> Czulość i specyficzność obliczane przez program statystyczny podczas analizy krzywej ROC to podstawowe miary wartości predykcyjnej reguły decyzyjnej – parametry kluczowe dla wyznaczenia optymalnego punktu odcięcia (punktu na krzywej ROC). Czulość definiowana jest jako, natomiast specyficzność jako . TP – prawidłowe wskazanie wyróżnionej klasy (ang. *true positive*); TN – prawidłowe niewskazanie drugiej z klas (ang. *true negative*); FP – niepoprawnie wskazanie wyróżnionej klasy (ang. *false positive*); FN – niewskazanie klasy wyróżnionej w sytuacji, gdy powinna być wskazana (ang. *false negative*). Jako klasę należy rozumieć jedną z podgrup przy dychotomicznym podziale badanej populacji, w przypadku niniejszej dysertacji jedną z klas stanowią mężczyźni nieplodni, drugą płodni.

## 4. WYNIKI BADAŃ

### 4.1. Podstawowa analiza seminologiczna – porównanie badanych grup mężczyzn

W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych, mających na celu porównanie grupy mężczyzn niepłodnych i z potwierdzoną płodnością wykazano, że pierwsza z tych grup była istotnie statystycznie starsza (mediana: 33,00 r.ż. vs. 31,00 r.ż.) i miała istotnie słabszą jakość nasienia. W grupie mężczyzn niepłodnych w ich nasieniu zaobserwowano istotnie niższą koncentrację plemników (mediana:  $16,69 \times 10^6/\text{mL}$  vs.  $54,50 \times 10^6/\text{mL}$ ), całkowitą ich liczbę (mediana:  $46,32 \times 10^6/\text{ejakulat}$  vs.  $164,00 \times 10^6/\text{ejakulat}$ ), odsetek plemników charakteryzujący się prawidłową budową morfologiczną (mediana: 0,00% vs. 4,00%), odsetek gamet z ruchem postępowym (mediana: 33,00% vs. 67,00%), niepostępowym (mediana: 6,00% vs. 8,00%), ruchem całkowitym (mediana: 43,00% vs. 78,00%), odsetek plemników żywych eozynonegatywnych (mediana: 74,00% vs. 84,00%) i żywych HOS test-pozytywnych (mediana: 71,00% vs. 80,00%), natomiast odsetek komórek rozrodczych mających strukturalne wady główki (mediana: 99,00% vs. 92,00%), wstawki (mediana 43,00% vs. 36,00%), witki (mediana: 32,00% vs. 25,00%) i mających resztkową cytoplazmę o powierzchni większej niż 1/3 główki plemnika (mediana: 5,00% vs. 3,00%) oraz odsetek gamet niewykazujących ruchu (mediana: 57,00% vs. 23,00%) był istotnie wyższy. Ponadto, w grupie mężczyzn niepłodnych stwierdzono istotnie wyższą koncentrację komórek okrągłych linii spermatogenicznej (mediana:  $0,15 \times 10^6/\text{mL}$  vs.  $0,00 \times 10^6/\text{mL}$ ), wyższą wartość TZI (mediana: 1,81 vs. 1,62) oraz wyższą koncentrację peroksydazo-dodatnich komórek układu odpornościowego (mediana:  $0,500 \times 10^6/\text{mL}$  vs.  $0,250 \times 10^6/\text{mL}$ ). W przypadku objętości ejakulatu brak było istotnych różnic między badanymi grupami mężczyzn (**Tabela 4**).

### 4.2. Rozszerzona analiza seminologiczna

#### 4.2.1. Ocena integralności genomu plemników i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w nasieniu – porównanie badanych grup mężczyzn

Na poczet niniejszych badań, rutynowa analiza seminologiczna została rozszerzona i uzupełniona o wyniki testu SCD oraz ocenę sORP w nasieniu. Porównanie grupy mężczyzn niepłodnych i płodnych ujawniło istotnie wyższy odsetek plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA (mediana: 20,00% vs. 13,00%) oraz istotnie wyższą wartość sORP (mediana: 2,16 vs. 0,66) w pierwszej z wymienionych grup (**Tabela 5**).

#### 4.2.2. Częstość występowania mężczyzn z SDF >20% i sORP >1,37 w badanych grupach

Kolejnym etapem przeprowadzonych analiz statystycznych było określenie i porównanie liczby mężczyzn u których, zgodnie z przyjętą wartością SDF dyskryminującą mężczyzn płodnych i niepłodnych, stwierdzono SDF >20% (*Agarwal i wsp., 2022; Esteves i wsp., 2021; Farkouh i wsp., 2022; Panner Selvam, 2021a; Santi i wsp., 2018*) oraz sORP >1,37 (zgodnie z sugestią producenta systemu MiOXSYS®). W grupie mężczyzn niepłodnych w porównaniu do grupy mężczyzn płodnych wykazano istotnie więcej badanych z SDF >20% (48,72% mężczyzn vs. 21,35% mężczyzn) oraz istotnie więcej z sORP >1,37 (66,66% mężczyzn vs. 15,73% mężczyzn) (**Tabela 6**).

#### 4.2.3. Iloraz szans na wystąpienie SDF >20% oraz sORP >1,37 w grupie mężczyzn niepłodnych w odniesieniu do grupy mężczyzn płodnych

W celu określenia statystycznego ryzyka na wystąpienie wartości SDF i sORP uznawanych za istotne w aspekcie klinicznym (SDF

**Tabela 4. Statystyka opisowa i porównanie wieku oraz standardowych parametrów seminologicznych między mężczyznami nieplodnymi i płodnymi**

Parametry	Cała badana populacja (n = 206)	Grupa mężczyzn nieplodnych (n = 117)	Grupa mężczyzn płodnych (n = 89)	p	
Wiek (lata)	33,00 (22,00–49,00) 33,10 ± 5,01	33,00 (25,00–49,00) 34,14 ± 5,08	31,00 (22,00–47,00) 31,73 ± 4,06	< 0,001	
Objętość nasienia (mL)	3,00 (0,50–8,00) 3,20 ± 1,57	3,00 (0,50–8,00) 3,14 ± 1,55	3,00 (0,50–7,00) 3,28 ± 1,62	NS	
Koncentracja plemników (×10 <sup>6</sup> /mL)	25,94 (0,05–210,00) 39,83 ± 38,54	16,69 (0,05–130,00) 27,35 ± 24,38	54,50 (6,10–210,00) 60,14 ± 41,72	< 0,000001	
Całkowita liczba plemników (×10 <sup>6</sup> )	78,19 (0,25–840,00) 121,46 ± 139,02	46,32 (0,25–460,50) 68,36 ± 77,70	164,00 (18,30–840,00) 191,28 ± 168,48	< 0,000001	
Plemniki morfologicznie prawidłowe (%)	1,50 (0,00–13,00) 2,50 ± 3,12	0,00 (0,00–10,00) 1,05 ± 1,99	4,00 (0,00–13,00) 4,42 ± 3,31	< 0,000001	
Szczegółowa morfologia plemników	Plemniki z wadami główki (%)	96,00 (72,00–100,00) 94,99 ± 5,22	99,00 (72,00–100,00) 97,26 ± 4,35	92,00 (81,00–100,00) 92,01 ± 4,76	< 0,000001
	Plemniki z wadami wstawki (%)	36,00 (9,00–96,00) 40,74 ± 18,33	43,00 (11,00–96,00) 45,74 ± 20,14	36,00 (9,00–73,00) 34,51 ± 13,38	< 0,001
	Plemniki z wadami włki (%)	29,00 (6,00–88,00) 31,23 ± 14,31	32,00 (6,00–88,00) 35,11 ± 15,66	25,00 (6,00–50,00) 26,14 ± 10,37	< 0,0001
	Plemniki z resztkową cytoplazmą (%)	4,00 (0,00–60,00) 5,04 ± 6,31	5,00 (0,00–60,00) 6,71 ± 7,58	2,00 (0,00–12,00) 2,84 ± 2,87	< 0,000001
TZI	1,74 (1,15–2,58) 1,75 ± 0,30	1,81 (1,28–2,58) 1,86 ± 0,31	1,62 (1,15–2,25) 1,62 ± 0,21	< 0,000001	
Plemniki wykazujące ruch postępowy (RP) (%)	51,50 (0,00–90,00) 47,58 ± 22,85	33,00 (0,00–79,00) 35,07 ± 20,10	67,00 (22,00–90,00) 64,02 ± 14,22	< 0,000001	
Plemniki wykazujące ruch niepostępowy (NP) (%)	7,00 (0,00–41,00) 8,94 ± 7,64	6,00 (0,00–41,00) 7,75 ± 6,87	8,00 (0,00–33,00) 10,50 ± 8,34	< 0,05	
Ruch całkowity plemników (PR + NP) (%)	59,00 (0,00–98,00) 56,52 ± 24,49	43,00 (0,00–81,00) 42,82 ± 21,68	78,00 (28,00–98,00) 74,52 ± 14,17	< 0,000001	
Plemniki niewykazujące ruchu (%)	41,00 (2,00–100,00) 43,47 ± 24,49	57,00 (19,00–100,00) 57,17 ± 21,68	22,00 (2,00–72,00) 25,47 ± 14,17	< 0,000001	
Plemniki eozyno-negatywne – żywe (%)	78,00 (15,00–98,00) 75,94 ± 12,28	74,00 (15,00–90,00) 71,05 ± 12,49	84,00 (61,00–98,00) 82,37 ± 8,49	< 0,000001	
Plemniki HOS test-pozytywne – żywe (%)	n = 184 75,00 (0,00–98,00) 73,32 ± 13,13	n = 99 71,00 (0,00–90,00) 68,57 ± 14,33	n = 84 80,00 (58,00–98,00) 78,92 ± 8,77	< 0,000001	
Komórki okrągłe linii spermatogenicznej (×10 <sup>6</sup> /mL /mL)	0,00 (0,00–6,50) 0,36 ± 0,84	0,15 (0,00–6,50) 0,43 ± 0,89	0,00 (0,00–4,75) 0,27 ± 0,77	< 0,0001	
Komórki peroksydazo- -dodatnie (×10 <sup>6</sup> /mL)	0,25 (0,00–15,00) 0,90 ± 1,87	0,50 (0,00–15,00) 1,30 ± 2,36	0,25 (0,00–3,25) 0,38 ± 0,55	0,000001	

Prezentowane dane zostały wyrażone za pomocą mediany (zakres) oraz średniej ± SD, HOS test – test hipoosmotyczny; TZI – indeks teratozoospermii; n – liczba badanych; NS – brak istotności statystycznej; SD – odchylenie standardowe. Istotność statystyczna testu Manna–Whitneya była uznawana gdy p < 0,05

**Tabela 5. Statystyka opisowa i porównanie SDF i sORP między mężczyznami nieplodnymi i płodnymi**

Parametry	Cała badana populacja (n = 206)	Grupa mężczyzn nieplodnych (n = 117)	Grupa mężczyzn płodnych (n = 89)	p
SDF (%)	17,00 (2,00–55,00) 18,41 ± 8,77	20,00 (5,00–55,00) 21,40 ± 8,67	13,00 (2,00–34,00) 14,49 ± 7,28	< 0,000001
sORP (mV/×10 <sup>6</sup> plemników/mL)	1,21 (0,016–169,11) 6,91 ± 21,46	2,16 (0,095–169,11) 11,50 ± 27,65	0,66 (0,016–5,00) 0,87 ± 0,85	< 0,000001

Prezentowane dane zostały wyrażone za pomocą mediany (zakres) oraz średniej ± SD, SDF – fragmentacja jądrowego DNA plemników; sORP – znormalizowany potencjał oksydacyjno-redukcyjny; n – liczba badanych; NS – brak istotności statystycznej; SD – odchylenie standardowe. Istotność statystyczna testu Manna–Whitneya była uznawana gdy p < 0,05

**Tabela 6. Częstość występowania SDF >20% i sORP >1,37 w badanych grupach mężczyzn**

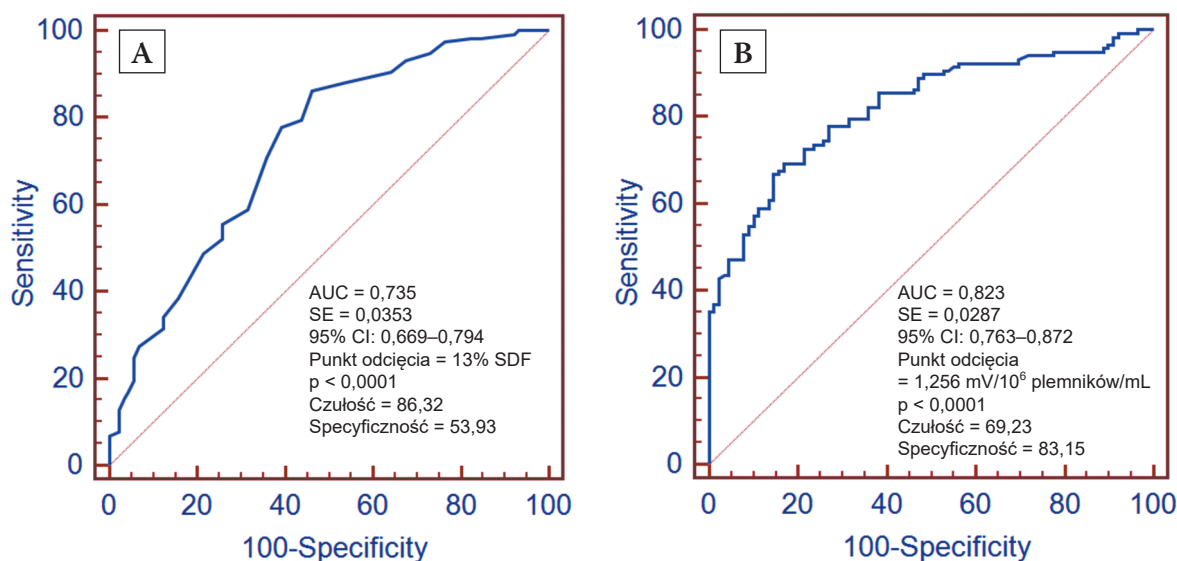
Parametry	Grupa mężczyzn niepłodnych %(n)	Grupa mężczyzn płodnych %(n)	p
SDF >20%	48,72(57)	21,35(19)	0,0001
sORP >1,37 (mV/×10 <sup>6</sup> plemników/mL)	66,66(78)	15,73(14)	< 0,0001

SDF – fragmentacja jądrowego DNA plemników; sORP – znormalizowany potencjał oksydacyjno–redukcyjny; n – liczba badanych. Istotność statystyczna testu Chi<sup>2</sup> była uznawana gdy p < 0,05

**Tabela 7. Iloraz szans (OR) na wystąpienie SDF >20% i sORP >1,37 w grupie mężczyzn niepłodnych w odniesieniu do grupy mężczyzn płodnych**

Parametry	Grupa mężczyzn niepłodnych %(n)	Grupa mężczyzn płodnych %(n)	OR 95% CI p
SDF >20%	48,72(57)	21,35(19)	3,5000 1,8766–6,5277 0,0001
sORP >1,37 (mV/×10 <sup>6</sup> plemników/mL)	66,66(78)	15,73(14)	10,7143 5,3847–21,3190 < 0,0001

95% CI – 95% przedział ufności; SDF – fragmentacja jądrowego DNA plemników; sORP – znormalizowany potencjał oksydacyjno–redukcyjny; n – liczba badanych. Istotność statystyczna testu była uznawana gdy p < 0,05

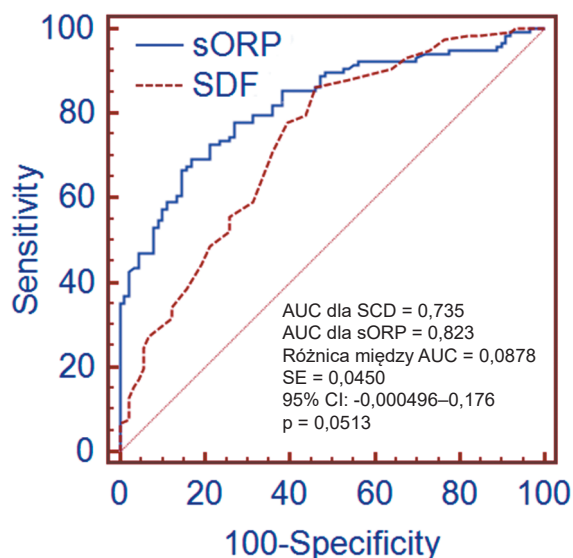


**Rycina 7.** Analiza krzywej ROC (ang. *receiving operating characteristic*) i pola powierzchni pod krzywą (AUC, ang. *area under curve*) w celu określenia wartości predykcyjnej dla odróżnienia mężczyzn niepłodnych (n = 117) od płodnych (n = 89) w badanej populacji. Krzywa ROC wyznaczona dla określenia wartości testu dyspersji chromatyny plemników (SCD, ang. *sperm chromatin dispersion*) (A) oraz dla testu weryfikującego potencjał oksydacyjno–redukcyjny (sORP, ang. *static oxidation–reduction potential*) w nasieniu z pomocą systemu MiOXSYS® (B). Wartością graniczną (punktem odcięcia) było 13% plemników z pofragmentowanym DNA (SDF) (A) oraz sORP = 1,256 mV/10<sup>6</sup> plemników/mL (B). Uzyskana wartość AUC = 0,735 wskazuje na satysfakcjonującą wartość predykcyjną testu SCD (A), natomiast wartość AUC = 0,823 wskazuje na dobrą wartość predykcyjną dla testu weryfikującego sORP (B). p ≤ 0,05 – statystyczna istotność między obliczoną wartością AUC vs. AUC = 0,500 (wartość stała zgodna z założeniami hipotezy zerowej), 95% CI – 95% przedział ufności; SE – błąd standardowy

>20% i sORP >1,37), przeprowadzono analizę ilorazu szans (OR). Wykazano, że grupa mężczyzn niepełnych miała 3,5-krotnie wyższe ryzyko na wystąpienie SDF >20% i ponad 10-krotnie wyższe ryzyko na wystąpienie sORP >1,37 niż grupa mężczyzn płodnych (Tabela 7).

#### 4.3. Wartość prognostyczna testu SCD i testu weryfikującego sORP w nasieniu dla odróżnienia mężczyzn niepełnych od płodnych – analiza krzywej ROC

W celu określenia wartości predykcyjnej wykorzystanych testów, w badanych grupach mężczyzn ustalono, na podstawie analizy krzywej ROC, wartości graniczne SDF i sORP, powyżej których istniało statystyczne ryzyko niepłodności męskiej. W przypadku testu SCD punktem odcięcia była wartość SDF = 13% (AUC = 0,735; czułość = 86,32; specyficzność = 53,93; satysfakcjonująca wartość prognostyczna) (Rycina 7A), natomiast w przypadku oceny potencjału oksydacyjno-redukcyjnego była wartość sORP = 1,256 (AUC = 0,823; czułość = 69,23; specyficzność = 83,15; dobra wartość prognostyczna) (Rycina 7B). Mimo, iż AUC w zakresie >0,7–0,8 uznawane jest za satysfakcjonujące w prognozowaniu danego zjawiska a >0,8–0,9 za dobre, to jednak nie wykazano aby pola



Rycina 8. Porównanie krzywych ROC (ang. *receiving operating characteristic*) i pól powierzchni pod krzywą (AUC, ang. *area under curve*) wyznaczonych dla określenia wartości predykcyjnej testu dyspersji chromatyny plemników (SCD, ang. *sperm chromatin dispersion*) oraz dla testu weryfikującego potencjał oksydacyjno-redukcyjny (sORP, ang. *static oxidation-reduction potential*) w nasieniu za pomocą systemu MiOXSYS® dla odróżnienia mężczyzn niepełnych (n = 117) od płodnych (n = 89) w badanej populacji. p – statystyczna istotność między wartością AUC dla SCD vs. AUC dla sORP, 95% CI – 95% przedział ufności; SE – błąd standardowy

powierzchni pod krzywymi ROC, dla przeprowadzonych testów diagnostycznych, różniły się istotnie statystycznie (Rycina 8).

## 5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. Mężczyźni niepłodni (n = 117) mieli istotnie mniejszą koncentrację plemników ejakulowanych, całkowitą ich liczbę, ruchliwość i morfologię w porównaniu do mężczyzn płodnych (n = 89). Szczegółowa analiza morfologiczna wykazała także istotnie większą liczbę wad główki, wstawki, witki i plemników z resztkową cytoplazmą w grupie mężczyzn niepłodnych.

2. Mężczyźni niepłodni mieli istotnie większy odsetek plemników z pofragmentowany jądrowym DNA (SDF) i istotnie większą znormalizowaną wartość potencjału oksydacyjno–redukcyjnego (sORP) w nasieniu vs. mężczyźni płodni.

3. Liczba mężczyzn z wartością SDF >20% (klinicznie istotny poziom uszkodzenia DNA) była istotnie wyższa wśród mężczyzn niepłodnych vs. mężczyźni płodni.

4. Liczba mężczyzn z wartością sORP >1,37 odzwierciedlająca stres oksydacyjny w nasieniu była istotnie wyższa wśród mężczyzn niepłodnych vs. mężczyźni płodni.

5. Ryzyko na wystąpienie SDF >20% i sORP >1,37 było odpowiednio 3,5-krotnie i ponad 10-krotnie wyższe dla mężczyzn niepłodnych vs. mężczyźni płodni.

6. Analiza krzywej ROC wykazała, że w badanej populacji mężczyzn wartości SDF = 13% i sORP = 1,256 były wartościami granicznymi powyżej, których istniało statystyczne ryzyko niepłodności męskiej. Wartość pola powierzchni pod krzywymi ROC (odpowiednio AUC = 0,735; oraz AUC = 0,823) wskazywała na satysfakcjonującą wartość prognostyczną testu SCD i dobrą wartość prognostyczną testu weryfikującego sORP w nasieniu. Wartości AUC nie różniły się istotnie statystycznie.

## 6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

### 6.1. Mężczyźni nieplodni mają obniżone podstawowe parametry nasienia w porównaniu do mężczyzn płodnych

Przeprowadzone badania autorskie na próbkach nasienia pochodzących od 206 mężczyzn (117 mężczyzn nieplodnych oraz 89 mężczyzn z potwierdzoną płodnością) wykazały istotne różnice pomiędzy badanymi grupami mężczyzn w zakresie ich wieku i wartości podstawowych parametrów seminologicznych. Mężczyźni nieplodni byli starsi, jednak różnica wieku nie była drastyczna (mediana 33 r.ż. vs 31 r.ż.). W podobnych badaniach innych autorów nieplodni pacjenci także byli starsi (Arafa, 2018; Gill i wsp., 2021; Majzoub i wsp., 201b, 2020; Nago i wsp., 2021; Panner Selvam i wsp., 2022; Pino i wsp., 2020). Nie można pominąć faktu, iż w grupie mężczyzn nieplodnych 10 z 117 (8,6%) miało normozoospermie, z kolei w grupie mężczyzn płodnych tylko 46 z 89 (51,7%) prezentowało prawidłowe parametry nasienia. Wyniki te zgodne są z doniesieniem Boeri i wsp., (2021). Autorzy ujawnili, że wśród mężczyzn nieplodnych 12% wykazywało normozoospermie, natomiast wśród płodnych 41%. **W niniejszej dysertacji nieplodni mieli istotnie słabszą jakość nasienia, w tym niższą liczbę plemników w ejakulacie, morfologię, ruchliwość i żywotność.** Podobne wyniki uzyskano w poprzednio przeprowadzonych badaniach współautorskich (Gill i wsp., 2021; 2022) oraz w badaniach innych autorów (Agarwal i wsp., 2017a; 2018a; 2019a; Arafa i wsp., 2018; Cicek i wsp., 2021; Douglas i wsp., 2021; Javed i wsp., 2019; Kuroda i wsp., 2023; Majzoub i wsp., 2018; 2020; Panner Selvam i wsp., 2022; Walke i wsp., 2023).

Agarwal i wsp., (2018a) wykazali statystyczną różnicę pomiędzy grupą mężczyzn nieplodnych (n = 293) i płodnych (n = 15) w zakresie koncentracji, całkowitej ruchliwości

i morfologii plemników. Warto podkreślić, że w badaniach tych liczebność grupy kontrolnej była bardzo ograniczona. Arafa i wsp., (2018) i Giwercman i wsp., (2010) oraz Gill i wsp., (2021; 2022) uzyskali podobne wyniki przy wyższej liczbie mężczyzn płodnych (odpowiednio: 365 vs. 50 (grupa płodnych); 127 vs. 137; 95 vs. 64; 77 vs. 80). Ponadto Gill i wsp., (2022) ujawnili także istotną różnicę w ruchu postępowym i żywotności męskich komórek rozrodczych. Z kolei Nguyen i wsp., (2023) nie wykryli istotnych różnic w żywotności plemników pomiędzy mężczyznami z prawidłowymi parametrami nasienia (n = 31) oraz mężczyznami, u których stwierdzono co najmniej jeden podstawowy parametr plemników poniżej dolnej wartości referencyjnej proponowanej przez WHO 2010 (n = 135). Ponadto Kuroda i wsp., (2023) w badaniu porównawczym nielicznej grupy mężczyzn z normozoospermia (n = 10) i mężczyzn nieplodnych z nieprawidłowymi parametrami nasienia (n = 10), oprócz istotnej różnicy w koncentracji i ruchu całkowitym plemników, nie wykryli różnic w morfologii i ruchu postępowym plemników. Można jednak przypuszczać, że czynnikiem wpływającym na brak różnic w odsetku plemników morfologicznie prawidłowych i wykazujących ruch, były analizy statystyczne przeprowadzone przez Kuroda i wsp., (2023) na niezwykle małych grupach badanych mężczyzn. Tak mała liczebność porównywanych grup niewątpliwie negatywnie wpływa na jakość i wiarygodność uzyskanych danych.

Inne istotne parametry seminologiczne związane z podstawową diagnostyką nasienia weryfikowane w niniejszych badaniach autorskich to indeks teratozoospermi (TZI) odzwierciedlający liczbę defektów strukturalnych przypadających na jeden plemnik oraz



parametry szczegółowej analizy morfologicznej męskich gamet. W grupie mężczyzn niepłodnych średnia wartość TZI była istotnie wyższa ( $1,86 \pm 0,31$ ) w porównaniu do mężczyzn płodnych ( $1,62 \pm 0,21$ ). Także odsetek męskich komórek rozrodczych zawierających zaburzenia strukturalne główki (mediana 99%), wstawki (mediana 43%) i witki (mediana 32%) był istotnie wyższy (odpowiednio vs. 92%; 36%; 25%). Należy zwrócić uwagę, że średnia wartość TZI dla mężczyzn płodnych była wyższa od średniej wartości podanej przez *WHO, 2010 i 2021* dla mężczyzn płodnych (TZI =  $1,51 \pm 0,2$ ). Podwyższona wartość TZI w stosunku do proponowanej przez WHO mogła być spowodowana tym, że wśród badanych mężczyzn płodnych aż 43 z 89 (48,3%) miało nieprawidłowe parametry seminologiczne. Należy zauważyć, że w grupie tej zdecydowanie dominującym zaburzeniem była teratozoospermia. Można jednak sądzić, że w badanych przypadkach niepłodności mogło dochodzić częściej do zaburzeń morfogenezy plemników związanej z różnicowaniem się okrągłej spermatydy w wydłużoną (spermiogeneza). Powyższe wyniki były zgodne z danymi uzyskanymi w poprzednio przeprowadzonych badaniach współautorskich (*Gill i wsp., 2022*). Także mężczyźni niepłodni mieli wyższą wartość TZI oraz wyższy odsetek plemników zawierających wady główki, wstawki i witki. *Majzoub i wsp., (2018)* oraz *Oumaima i wsp., (2018)* zaobserwowali także istotnie więcej plemników z wadami główki u mężczyzn niepłodnych (vs. płodni). Nie stwierdzili jednak różnic w odsetku męskich gamet z wadami wstawki i witki. Z kolei *Mangiariani i wsp., (2013)* wykazali, że mężczyźni z teratozoospermia mieli wyższe odsetki plemników z wadą główki, szyjki i witki niż mężczyźni z normozoospermia. Zbliżone dane uzyskali *Jakubik-Uljasz i wsp., (2020)*. Autorzy zaobserwowali,

że u mężczyzn z teratozoospermia indeks TZI i odsetek męskich komórek rozrodczych z wadami główki, wstawki i witki był istotnie wyższy w porównaniu do mężczyzn bez teratozoospermii.

## 6.2. Mężczyźni niepłodni mają wyższe ryzyko uszkodzenia chromatyny plemników oraz wyższe ryzyko stresu oksydacyjnego w nasieniu niż mężczyźni płodni

Obok standardowej oceny plemników, która ma niską wartość w przewidywaniu ich zdolności do zapłodnienia, w niniejszej dysertacji dokonano jednoczesnej oceny integralności genomu plemników i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, co jest jak najbardziej uzasadnione, gdyż proponowane biomarkery mogą być ze sobą powiązane (*Barbarosie i wsp., 2021; Castleton i wsp., 2023; Dutta i wsp., 2022; Kuroda i wsp., 2023; Majzoub i wsp., 2018, 2020; Martins i Agarwal, 2019; Santi i wsp., 2018*) i mogą mieć wartość predykcyjną dla sukcesu rozrodczego (*Agarwal i wsp., 2020b; Busnelli i wsp., 2023; Esteves i wsp., 2017; Haddock i wsp., 2021; Humaidan i wsp., 2022; Kocur i wsp., 2023*). Wiadomym jest, że czynniki środowiskowe (np. metale ciężkie, pestycydy, herbicydy, ftalany), wiek mężczyzny, jego styl życia (nadużywanie alkoholu, palenie papierosów, nieprawidłowa dieta, otyłość, stres) oraz choroby przewlekłe to zdecydowanie czynniki etiologiczne stresu oksydacyjnego, który jest jednym z istotnych przyczyn powodujących obniżenie integralności genomu plemników (**Rycina 5**), gdyż dochodzi do oksydacyjnego uszkodzenia ich DNA (*Agarwal i wsp., 2018c; Aitken, 2020; Nago i wsp., 2021; Takalani i wsp., 2023; Watanabe, 2022*).

Należy zaznaczyć, że niewiele jest doniesień w których autorzy dokonują jednoczesnej weryfikacji obu wymienionych parametrów. Podobne wyniki uzyskano w poprzednio przeprowadzonych współautorskich badaniach

(Gill i wsp., 2021; 2022), w których u mężczyzn niepełnych wartość SDF (mediana 18% lub 19%), jak również sORP (mediana 7,23 lub 4,90) była wyższa w porównaniu do mężczyzn płodnych (odpowiednio SDF 13%; sORP 0,81 lub 0,62). Inni autorzy również wykazali, że w przypadku męskiej niepłodności zwiększa się odsetek męskich gamet z uszkodzonym DNA (test SCD) i wartość sORP w nasieniu w porównaniu do płodnych (Majzoub i wsp., 2018, 2020) lub ochotników z normozoospermią (Kuroda i wsp., 2023). Ponadto Nguyen i wsp., (2023) porównując grupy mężczyzn niepełnych z nieprawidłowymi i prawidłowymi parametrami nasienia, w przypadku tych pierwszych stwierdził zwiększoną wartość SDF oraz sORP. Z kolei Joao i wsp., (2022) wykazali większe uszkodzenie DNA plemników (test TUNEL, ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) i większą wartość sORP w grupie mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami plemników w porównaniu do mężczyzn z normozoospermią, jednak w przypadku pierwszego parametru autorzy nie uzyskali istotności statystycznej.

Niektórzy autorzy potwierdzili również (bez oceny sORP), że mężczyźni niepełni mają bardziej uszkodzony materiał genetyczny niż płodni (metodą SCD) (DeVilbiss i wsp., 2022; Giwerzman i wsp., 2010; Javed i wsp., 2019, Marinaro i Schlegel, 2023; Wiweko i Utami, 2017; Zandieh i wsp., 2018), natomiast inni udowodnili (bez oceny integralności DNA plemników), że wartość sORP zdecydowanie zwiększała się wśród tej grupy mężczyzn (Agarwal i wsp., 2017a, 2018a; Arafat i wsp., 2018) oraz w grupie badanych z nieprawidłowymi parametrami nasienia w porównaniu do mężczyzn z normozoospermią (Agarwal i wsp., 2017c, 2019a; Cicek i wsp., 2021; Douglas i wsp., 2021).

Obok opisanej powyżej analizy porównawczej integralności DNA plemników i potencjału oksydacyjno–redukcyjnego w nasieniu

dokonano porównania liczby mężczyzn, u których zgodnie z przyjętą wartością SDF odróżniającą mężczyzn niepełnych od płodnych stwierdzono SDF >20% (Agarwal i wsp., 2022; Esteves i wsp., 2021; Farkouh i wsp., 2022; Panner Selvam i wsp., 2021a; Santi i wsp., 2018) i sORP >1,37 wskazujący na stres oksydacyjny (zgodnie z sugestią producenta systemu MiOXSYS®) (Agarwal i wsp., 2018b). Ponadto oszacowano ryzyko na wystąpienie SDF >20% i sORP >1,37. Do niedawna wykorzystywano kliniczny podział stopnia fragmentacji jądrowego DNA na niski poziom uszkodzenia (<15%), pośredni (15–30%) oraz wysoki (>30%). Średni i wysoki poziom uszkodzenia DNA wiązał się z niższą szansą uzyskania potomstwa, zajęcia w ciążę kliniczną oraz wzrostem ryzyka poronienia (Agarwal i wsp., 2017b; Elbardisi i wsp., 2020; Gill i wsp., 2021). W najnowszych jednak opracowaniach stwierdzono, iż nową wartością odcięcia SDF determinującą płodność męską jest 20% plemników z pofragmentowanym DNA (weryfikacja za pomocą następujących testów: SCSA [ang. *sperm chromatin structure assay*], TUNEL, SCD, komety). Stwierdzono niekorzystne skutki rokownicze przy wartościach SDF z przedziału 20–30%, takie jak przedłużony okres starań prokreacyjnych, zmniejszenie szansy na uzyskanie ciąży metodą naturalną, za pomocą inseminacji, metody ICSI (ang. *intracytoplasmic sperm injection*) oraz zwiększone ryzyko poronień (Agarwal i wsp., 2017b; Elbardisi i wsp., 2020; Santi i wsp., 2018).

W niniejszych badaniach ujawniono, że wśród mężczyzn niepełnych istotnie więcej było osób z SDF >20% (48,72% vs 21,35%). Ponadto badani mieli 3,5-krotnie wyższe ryzyko na wystąpienie SDF >20% niż mężczyźni płodni. Należy podkreślić, że wśród mężczyzn niepełnych istotnie częściej występował stres oksydacyjny (sORP >1,37) (66,67% vs 15,73%) i mieli oni ponad 10-krotnie wyższe

ryzyko na wystąpienie tego stresu. Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych przez Zakład Histologii i Biologii Rozwoju (Gill i wsp., 2019a, b) oraz współautorskich badaniach (Gill i wsp., 2021; 2022). Stwierdzono także zarówno większą dystrybucję SDF >20% lub >18% oraz większe ryzyko na występowanie tych wartości odpowiednio wśród niepłodnych w porównaniu do mężczyzn potencjalnie płodnych z normozoospermią (Gill i wsp., 2019b), bądź też wśród badanych z nieprawidłowymi podstawowymi parametrami plemników vs. normozoospermia (Gill i wsp., 2019a). Potwierdzono także, że u mężczyzn niepłodnych częściej występował stres oksydacyjny i istotnie większe ryzyko na jego pojawienie się w nasieniu (Gill i wsp., 2021; 2022), co było zgodne z wynikami Arafa i wsp., (2018). Inni autorzy (Bungum i wsp., 2011; Giwercman i wsp., 2010) przeprowadzili podobne analizy. Bungum i wsp., (2011) wykazali, że ryzyko na SDF >20% zdecydowanie jest większe wśród mężczyzn niepłodnych. Z kolei Giwercman i wsp., (2010) ustalili, że ryzyko na wystąpienie niepłodności jest większe w przypadku mężczyzn z SDF >20% w porównaniu do tych, u których wykazano SDF <10%.

Co ważne, z przeprowadzonych badań autorskich wynika, że pacjenci mający stres oksydacyjny w nasieniu (sORP >1,37) niekoniecznie muszą mieć tak obniżoną integralność genomu plemników, która miałaby istotną wartość kliniczną (czyli SDF >20%). W grupie mężczyzn niepłodnych częściej występował stres oksydacyjny (około 67% mężczyzn) niż SDF >20% (około 49% mężczyzn). Podkreśla to ważną rolę stresu oksydacyjnego w powstawaniu niepłodności. Natomiast w grupie płodnych proporcje badanych parametrów były odwrotne. Częściej dochodziło do niekorzystnego uszkodzenia DNA (21% mężczyzn z SDF >20%) niż stresu oksydacyjnego (16% z sORP >1,37). Należy być świadomym,

że fragmentacja DNA plemników może być spowodowana nie tylko stresem oksydacyjnym, ale zaburzeniem procesów związanych z nieprawidłową przebudową chromatyny różnicujących się spermatyd podczas spermiogenezy i z apoptozą komórek germinalnych (Agarwal i wsp., 2020b; Barbarosie i wsp., 2021; Okada, 2022a,b; Panner Selvam i wsp., 2021a; Poetsch, 2020; Watanabe, 2022). **Zatem weryfikacja obu badanych parametrów wydaje się niesłychanie istotna ze względu na prawidłowe spersonalizowane postępowanie terapeutyczne związane z prowadzeniem terapii antyoksydacyjnej.** Wykryto, iż sORP stanowi idealną miarę zdolności utleniania i redukcji. Ustalono fizjologiczny zakres sORP od  $-9,76 \text{ mV}/10^6$  do  $1,48 \text{ mV}/10^6$  plemników/mL) w oparciu o wpływ stresu oksydacyjnego i redukcyjnego na funkcje plemników oraz na ich zmiany molekularne (Alfaro Gomez i wsp., 2023; Dutta i wsp., 2022; Panner Selvam i wsp., 2020). Należy również wspomnieć o istniejącym ryzyku związanym z nieuzasadnioną terapią, która może prowadzić do stresu redukcyjnego (paradoks antyoksydacyjny), czyli przewagi procesów redukcyjnych nad procesami utleniania, które niekorzystnie będą wpływać na jakość nasienia (Agarwal i wsp., 2023; Dutta i wsp., 2022; Henkel i wsp., 2019; Panner Selvam i wsp., 2020).

### 6.3. Wartość prognostyczna testu SCD i testu weryfikującego sORP za pomocą systemu MiOXSYS®

Jak wspomniano wcześniej, wartością graniczną SDF odróżniających mężczyzn płodnych od niepłodnych była wartość SDF = 20% proponowana przez wielu autorów (Esteves i wsp., 2021; Agarwal i wsp., 2022; Panner Selvam i wsp., 2021a). Z kolei wartością graniczną sORP, powyżej której w nasieniu jest przewaga procesów utleniania nad procesami redukcji (stres oksydacyjny) zgodnie

z sugestią producenta systemu MiOXSYS® jest sORP = 1,37. Należy jednak zwrócić uwagę, że w najnowszych wytycznych *WHO (2021)* dotyczących badania nasienia, dopuszcza się, aby każde z laboratoriów przeprowadzające analizy seminologiczne, dla testów wykarczających poza podstawową analizę nasienia, wyznaczyło własne wewnętrzne wartości referencyjne dla tych testów. Dlatego też, w celu określenia optymalnej wartości punktu odcięcia dla SDF i sORP dyskryminującej mężczyzn niepełnych od płodnych, w niniejszej dysertacji dokonano analizy krzywych ROC oraz pól powierzchni znajdujących się pod tymi krzywymi. Uzyskane dane statystyczne wykazały, że w przypadku wyników testu SCD wartością graniczną było 13% plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA (AUC = 0,735, satysfakcjonująca wartość prognostyczna), natomiast w przypadku oceny potencjału oksydacyjno-redukcyjnego była to wartość sORP = 1,256 (AUC = 0,823, dobra wartość prognostyczna). Nie można pominąć faktu, że pola powierzchni pod krzywymi ROC uzyskanymi z dwóch niezależnych testów pomimo różnej wartości prognostycznej (satysfakcjonująca vs. dobra), nie różniły się istotnie statystycznie.

Uzyskany w niniejszym badaniu punkt odcięcia SDF = 13%, powyżej którego rosło ryzyko niepełności, był tożsamy z wartością graniczną SDF otrzymaną w poprzednio przeprowadzonych badaniach współautorskich (test SCD) wykonanych w Zakładzie Histologii i Biologii Rozwoju PUM (*Gill i wsp., 2022*). W innych badaniach, również wykonanych w tej samej Jednostce, w których analizowano mężczyzn niepełnych i zdrowych ochotników z normozoospermią (potencjalnie płodnych) wartością graniczną odróżniającą te grupy mężczyzn była wartość SDF = 18% (*Gill i wsp., 2019a*) lub 20% (*Gill i wsp., 2019b*). W obu przypadkach wartość

AUC wskazywała na satysfakcjonującą wartość predykcyjną testu SCD. Inni autorzy otrzymali zbliżone lub wyższe wartości SDF różnicujące mężczyzn niepełnych od płodnych: 16,80% (*Panner Selvam i Agarwal, 2018*), 18,50% (*Ribas-Naynou i wsp., 2012*), 24,74% (*Javed i wsp., 2019*), 25,50% (*Majzoub i wsp., 2018*) i 26,10% (*Wiweko i Utami 2017*). Należy zwrócić uwagę, że wymienione wartości SDF są niższe od wartości SDF proponowanej przez producenta testu Halosperm® G2, dla którego wartością prawidłową jest wartość SDF  $\leq 30\%$ . Biorąc pod uwagę wyniki badań autorskich i współautorskich oraz innych autorów wartość ta jest zdecydowanie zawyżona i stwarza ryzyko nieprawidłowego zinterpretowania wyniku jako poprawnego. Zgodnie z wynikami uzyskanymi w niniejszej dysertacji można sugerować, że mężczyźni z SDF w zakresie  $>13-30\%$  mogą wymagać interwencji terapeutycznych w celu podwyższenia integralności genomu ich plemników, aby zwiększyć szansę na sukces rozrodczy (*Gill i wsp., 2022, 2021, 2019a, 2019b; Nguyen i wsp., 2023; Panner Selvam i Agarwal 2018*).

Jak wspomniano wcześniej, w niniejszym badaniu stwierdzono, że sORP = 1,256 jest dobrą wartością prognostyczną dyskryminującą mężczyzn niepełnych od płodnych. Wynika z tego, że u mężczyzn, u których stwierdzono sORP  $>1,256$  występuje zwiększone ryzyko niepełności. Zgodnie z sugestią producenta systemu MiOXSYS® wartość sORP  $>1,37$  jest czynnikiem ryzyka stresu oksydacyjnego, który może być przyczyną niepełności. Zatem na podstawie uzyskanych badań autorskich wynika, że pacjenci z sORP  $>1,256-1,37$  już mogą wymagać interwencji terapeutycznej związanej z redukcją stresu oksydacyjnego.

Inni autorzy uzyskali podobne wyniki (*Agarwal i wsp., 2017a; Arafa i wsp., 2018; Gill i wsp., 2022*). *Agarwal i wsp., (2017a)* oraz

*Arafa i wsp., (2018)* ustalili, że sORP = 1,42 lub sORP = 1,41 było wartością odróżniającą mężczyzn niepłodnych od płodnych, co dalej było zgodne z opublikowanymi wcześniej wynikami badań współautorskich (*Gill i wsp., 2022*), w których wartością dyskryminującą wymienione grupy mężczyzn była wartości sORP = 1,40. Nie można pominąć faktu, że wielu autorów podejmowało również próbę oceny wartości prognostycznej testu weryfikującego sORP w nasieniu w celu odróżnienia mężczyzn z normozoospermią od mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami seminologicznymi (*Agarwal i Wang 2017; Agarwal i wsp., 2017c; 2019b; Arafa i wsp., 2018; Douglas i wsp., 2021; Joao i wsp., 2022; Nguyen i wsp., 2023*). Większość autorów uzyskała podobne wartości sORP dyskryminujące badane grupy mężczyzn, np.: sORP = 1,34 (*Agarwal i wsp., 2019a; Douglas i wsp., 2021*), sORP = 1,36 (*Agarwal i wsp., 2017c*), sORP = 1,38 (*Arafa i wsp., 2018*), sORP = 1,57 (*Agarwal i Wang, 2017*). Z kolei inni uzyskali zdecydowanie mniejszą wartość sORP: 0,79 (*Joao i wsp., 2022*) i 0,7 (*Nguyen*

*i wsp., 2023*). Nie można pominąć wyników opublikowanych przez *Henkel i wsp., (2022)*. Autorzy na podstawie analizy krzywej ROC wykazali, że gdy w nasieniu stwierdza się sORP  $\leq 0,709$  można spodziewać się, że procent zapłodnionych komórek jajowych w procedurze ICSI będzie wynosił  $>80\%$  (dobry współczynnik zapłodnienia komórki jajowej). Natomiast gdy sORP osiąga wartość  $\leq 0,530$  odsetek powstałych blastocyst może być  $>60\%$ , gdy sORP jest  $\leq 0,465$  rośnie istotnie szansa na uzyskanie klinicznej ciąży, z kolei przy sORP  $\leq 0,393$  zwiększa się szansa na urodzenie zdrowego dziecka. Ponadto badacze na podstawie powyższych wyników wykazali, że uśredniona wartość sORP  $< 0,51$  związana była ze zwiększeniem się szansy na korzystne wyniki procedury ICSI (*Henkel i wsp., 2022*). Można zatem stwierdzić, że uzyskane dane przez autorów wskazują na kluczową rolę równowagi między procesami utleniania i redukcji w nasieniu również w przypadku zastosowania metody ICSI, która pomija wiele naturalnych barier na drodze do uzyskania zapłodnienia i ciąży.

## 7. WNIOSKI

1. Istnieje związek między niepłodnością męską, konwencjonalną charakterystyką nasienia, integralnością genomu plemników i stresem oksydacyjnym w nasieniu.

2. Mężczyźni niepłodni w porównaniu do mężczyzn płodnych mają zdecydowanie wysokie ryzyko na wystąpienie klinicznie znaczącego uszkodzenia jądrowego DNA plemników i wystąpienia stresu oksydacyjnego w nasieniu, co w konsekwencji może obniżać zdolność ich plemników do zapłodnienia, zarówno w warunkach naturalnej koncepcji, jak i wspomaganą medycznie.

3. Zastosowane testy do oceny integralności genomu plemników i potencjału oksydacyjno–redukcyjnego w nasieniu mają istotną

wartość prognostyczną dla odróżnienia mężczyzn niepłodnych od płodnych.

4. Jednoczesna weryfikacja integralności genomu plemników i stresu oksydacyjnego w nasieniu powinna stanowić istotne uzupełnienie standardowej oceny nasienia, ze względu na:

- ▶ możliwość wyjaśnienia ewentualnej przyczyny obniżonej zdolności plemników do zapłodnienia,
- ▶ prawidłowe postępowanie terapeutyczne związane z wprowadzeniem terapii antyoksydacyjnej,
- ▶ spersonalizowane leczenie pacjenta, które może mieć na celu przywrócenie naturalnej płodności lub zwiększenie szansy na sukces reprodukcyjny w warunkach wspomaganego rozrodu.

## 8. SPIS RYCIN I TABEL

<b>Rycina 1.</b> Budowa chromatyny plemnika . . . . .	16
<b>Rycina 2.</b> Etapy powstawania reaktywnych form tlenu . . . . .	20
<b>Rycina 3.</b> Udział peroksydazy glutationowej (GPx-Se) w redukcji nadtlenku wodoru przy udziale zredukowanej formy glutationu (GSH). Utleniona forma glutationu (GSSG) ulega redukcji dzięki aktywności reduktazy glutationowej (GR) . . . . .	23
<b>Rycina 4.</b> Udział peroksydazy glutationowej (GPx-Se) w redukcji wodoronadtlenków lipidów (LOOH) do ich pochodnych hydroksylowych (LOH) z formą selenodisulfidową (LO-SG) jako formą pośrednią . . . . .	23
<b>Rycina 5.</b> Przyczyny i konsekwencje stresu oksydacyjnego w układzie płciowym męskim . . . . .	27
<b>Rycina 6.</b> Oksydaza NADPH i jej rola w plemniku . . . . .	28
<b>Rycina 7.</b> Analiza krzywej ROC i pola powierzchni pod krzywą (AUC) . . . . .	45
<b>Rycina 8.</b> Porównanie krzywych ROC i pól powierzchni pod krzywą (AUC) . . . . .	46
<b>Tabela 1.</b> Podział reaktywnych form tlenu wraz z przykładami . . . . .	19
<b>Tabela 2.</b> Podział reaktywnych form azotu wraz z przykładami . . . . .	21
<b>Tabela 3.</b> Podział antyoksydantów . . . . .	21
<b>Tabela 4.</b> Statystyka opisowa i porównanie wieku oraz standardowych parametrów seminologicznych między mężczyznami niepłodnymi i płodnymi . . . . .	44
<b>Tabela 5.</b> Statystyka opisowa i porównanie SDF i sORP między mężczyznami niepłodnymi i płodnymi . . . . .	44
<b>Tabela 6.</b> Częstość występowania SDF >20% i sORP >1,37 w badanych grupach mężczyzn . . . . .	45
<b>Tabela 7.</b> Iloraz szans (OR) na wystąpienie SDF >20% i sORP >1,37 w grupie mężczyzn niepłodnych w odniesieniu do grupy mężczyzn płodnych . . . . .	45

## 9. PIŚMIENNICTWO

1. Abdullah F, Khan Nor-Ashikin M, Agarwal R., Kamsani Y., Malek M., Bakar N., et al.: Glutathione (GSH) improves sperm quality and testicular morphology in streptozotocin-induced diabetic mice. *Asian J Androl* 2021;23:281-287.
2. Adeoye O., Olawumi J., Opeyemi A., Christiania O.: Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod* 2018;22:61-66.
3. Agarwal A., Arafa M., Chandrakumar R., Majzoub A., AlSaid S., Elbardisi H.: A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation-reduction potential, a reliable and reproducible method. *Andrology* 2017a;5:939-945.
4. Agarwal A., Barbárošie C., Ambar R., Finelli R.: The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. *Int J Mol Sci* 2020a;21:3882.
5. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho C., Henkel R., Vij S., et al.: Male infertility. *Lancet* 2021;397:319–333.
6. Agarwal A., Bui A.: Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility. *Investig Clin Urol* 2017;58:385–399.
7. Agarwal A., Cannarella R., Saleh R., Harraz A., Kandil H., Salvio G., et al: Impact of Antioxidant Therapy on Natural Pregnancy Outcomes and Semen Parameters in Infertile Men: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The world journal of men's health* 2023;41:14–48.
8. Agarwal A., Cho C., Esteves S.: Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016a;28:164–171.
9. Agarwal A., Cho C., Majzoub A., Esteves S.: The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Transl Androl Urol* 2017b;6:720–733.
10. Agarwal A., Farkouh A., Parekh N., Zini A., Arafa M., Kandil H., et al.: Sperm DNA Fragmentation: A Critical Assessment of Clinical Practice Guidelines. *World J Mens Health* 2022;40:30-37.
11. Agarwal A., Gupta S., Sharma R.: Oxidation-Reduction potential measurement in ejaculated semen samples. In Agarwal A., Gupta S., Sharma R. *Andrological evaluation of male infertility: A laboratory guide*, 2016b;22,165–170. *Springer Nature*.
12. Agarwal A., Henkel R., Sharma R., Tadros N., Sabanegh E.: Determination of seminal oxidation-reduction potential (ORP) as an easy and cost-effective clinical marker of male infertility. *Andrologia*, 2018a;50,1-8.
13. Agarwal A., Majzoub A., Baskaran S., Panner Selvam M., Cho C., Henkel R., et al.: Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *The world journal of men's health* 2020b;38,412–471.
14. Agarwal A., Majzoub A., Esteves S., Ko E., Ramasamy R., Zini A.: Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl. Androl. Urol.* 2016c;5:935-950.
15. Agarwal A., Panner Selvam M., Baskaran S., Cho C.; Sperm DNA damage and its impact on male reproductive health: A critical review for clinicians, reproductive professionals and researchers. *Expert Rev.Mol. Diagn* 2019b;19:443-457.
16. Agarwal A., Panner Selvam M., Arafa M., Arafa M., Okada H., et al.: Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. *Asian J Androl* 2019a;21:565-569.
17. Agarwal A., Parekh N., Panner Selvam M., Henkel R., Shah R. Homa S., et al.: Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health* 2019c;37(3):296-312.
18. Agarwal A., Qiu E., Sharma R.: Laboratory assessment of oxidative stress in semen. *Arab J Urol* 2018b;16:77–86.
19. Agarwal A., Rana M., Qiu E., AlBunni H., Bui A., Henkel R.: Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility *Andrologia* 2018c;50:13126.
20. Agarwal A., Roychoudhury S., Bjugstad K., Cho C.: Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility?. *Ther Adv Urol* 2016d;8:302-318.
21. Agarwal A., Roychoudhury S., Sharma E., Tadros N., Sabanegh N.: Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reprod Biomed Online* 2017c;34:48-57.
22. Agarwal A., Sharma R., Roychoudhury S., Du Plessis S., Sabanegh E.: MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. *Fertil Steril* 2016e;106:566-573.
23. Agarwal A., Wang S.: Clinical Relevance of Oxidation-Reduction Potential in the Evaluation of Male Infertility. *Urology* 2017;104:84-89.
24. Ahmadi S., Bashiri R., Ghadiri-Anari A., Nadjarzadeh A.: Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J Reprod Biomed* 2016;14(12):729-736.
25. Aitken R., Baker M., Nixon B.: Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl* 2015;17:633-639.



26. Aitken R., Bakos H.: Should we be measuring DNA damage in human spermatozoa? New light on an old question. *Hum Reprod* 2021;36:1175-1185.
27. Aitken R., Drevet J., Moazamian A., Gharagozloo P.: Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms. *Antioxidants (Basel)* 2022;11:306.
28. Aitken R., Drevet J.: The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants (Basel)* 2020;9:111.
29. Aitken R., Lewis S.: DNA damage in testicular germ cells and spermatozoa. When and how is it induced? How should we measure it? What does it mean? *Andrology* 2023; 11:1545-1557.
30. Aitken R.: Are the MiOXSYS and OxiSpermII assays suitable for detecting oxidative stress in human semen samples?. *Andrology* 2023;11:1579-1580.
31. Aitken R.: DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in offspring. *Transl Androl Urol* 2017a;4:761-764.
32. Aitken R.: Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction* 2020;159:189-201.
33. Aitken R.: Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 2017b;84:1039-1052.
34. Alfaro Gómez M.; Fernández-Santos M.; Jurado-Campos A.; Soria-Meneses P.J.; Montoro Angulo V.; Soler A.J., et al.: On Males, Antioxidants and Infertility (MOXI): Certitudes, Uncertainties and Trends. *Antioxidants* 2023, 12, 1626.
35. Ali I., Shah S., Jin Y, Li Z., Ullah O, Fang N., et al.: Reactive oxygen species-mediated unfolded protein response pathways in preimplantation embryos. *J Vet Sci* 2017;18:1-9.
36. Ancuelo A., Landicho M., Dichoso G., Sangel P.: Superoxide Dismutase (SOD) Activity in Cryopreserved Semen of Itik Pinas-Khaki (*Anas platyrhynchos* L.). *Tropical Animal Science Journal* 2021;44,138-145.
37. Antony S., Jiang G., Wu Y., Metzler J., Makhlof H., Haines D., et al.: NADPH oxidase 5 (NOX5)-induced reactive oxygen signaling modulates normoxic HIF-1 $\alpha$  and p27<sup>Kip1</sup> expression in malignant melanoma and other human tumors. *Mol Carcinog* 2017;56:2643-2662.
38. Arafa M., Agarwal A., Al Said S., Majzoub A., Sharma R., Bjugstad K., et al.: Semen quality and infertility status can be identified through measures of oxidation-reduction potential. *Andrologia* 2018;50,1-6.
39. Asadi A., Ghahremani R., Abdolmaleki A., Rajaei F.: Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility. *International journal of reproductive biomedicine* 2021;19, 493-504.
40. Assidi M.: Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics. *Cells* 2022; 11:1711.
41. Azzi A.: Oxidative Stress: What Is It? Can It Be Measured? Where Is It Located? Can It Be Good or Bad? Can It Be Prevented? Can It Be Cured?. *Antioxidants* 2022;11:1431.
42. Bălăceanu R., Nimigean V., Nimigean V., Raită Ș., Ognean L., Dojană N.: Vitamin E and Selenium Given as Dietary Supplements Accumulate in Tissues and Semen and Improve Reproductive Parameters in Older Red Cornish. *The journal of poultry science* 2022;59,96-103.
43. Barati E., Nikzad H., Karimian M.: Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci* 2020;77:93-113.
44. Barbăroșie C, Agarwal A, Henkel R.: Diagnostic value of advanced semen analysis in evaluation of male infertility. *Andrologia* 2021;53:13625.
45. Baskaran S., Finelli R., Agarwal A., Henkel R.: Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane?. *Andrologia* 2021;53:13577.
46. Baskaran S., Panner Selvam K., Agarwal A.: Exosomes of male reproduction. *Advances in Clinical Chemistry* 2020;95;149-163.
47. Bibov M., Kuzmin A., Alexandrova A., Chistyakov V., Dobaeva N., Kundupyan O.: Role of the reactive oxygen species induced DNA damage in human spermatozoa dysfunction. *AME Med J* 2018;3:1-5.
48. Björndahl L., Esteves S., Ferlin A., Jørgensen N., O'Flaherty C.: Improving standard practices in studies using results from basic human semen examination. *Andrology* 2023;11:1225-1231.
49. Boeri L., Belladelli F., Capogrosso P., Cazzaniga W., Candela L., Pozzi E., et al.: Normal sperm parameters per se do not reliably account for fertility: A case-control study in the real-life setting. *Andrologia* 2021;53,1-9.
50. Boeri L., Fallara G., Pozzi E., Belladelli F., Corsini C., Raffo M., et al.: The impact of different WHO reference criteria for semen analysis in clinical practice: Who will benefit from the new 2021 thresholds for normal semen parameters?. *Andrology* 2022;10,1134-1142.
51. Boguenet M., Bouet P., Spiers A., Reynier P., May-Panloup P.: Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Hum Reprod Update* 2021;27:697-719.
52. Brandt J., Cruz Ithier M., Rosen T., Ashkinadze E.: Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenatal diagnosis* 2019; 39, 81-87.
53. Brewer A., Mustafi S., Murray T., Rajasekaran N., Benjamin I.: Reductive stress linked to small HSPs, G6PD, and Nrf2 pathways in heart disease. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1114-1127.

54. Brieger K., Schiavone S., Miller F., Krause K.: Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012;142:13659.
55. Budzińska M., Kamieniczna M., Wojnar L., Gill, K., Piasecka, M., Kups, M.: The role of the intrinsic pathway of apoptosis in human ejaculated sperm damage under a state of scrotal heat stress. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2024; 41, 99–108.
56. Bui A., Sharma R., Henkel R., Agarwal A.: Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia* 2018;50:13012.
57. Bungum M., Bungum L., Giwercman A.: Sperm chromatin structure assay (SCSA): A tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J. Androl* 2011;13,69–75.
58. Busnelli A., Garolla A., Di Credico E., D'Ippolito S., Merola A., Milardi D., et al.: Sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: Results from a multicenter case-control study. *Andrology* 2023;11, 1673–1681.
59. Calogero A., Cannarella R., Agarwal A., Hamoda M., Rambhatla A., Saleh R. et al.: The Renaissance of Male Infertility Management in the Golden Age of Andrology. *World J Mens Health* 2023;41:237-254.
60. Cannarella R., Condorelli R., Mongioì L., La Vignera S., Calogero A.: Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *Int J Mol Sci* 2020;21:1728.
61. Castleton P., Deluao J., Sharkey D., McPherson N.: Measuring Reactive Oxygen Species in Semen for Male Preconception Care: A Scientist Perspective. *Antioxidants* 2022;11:264.
62. Castleton P., Gyawali P., Mathews N., Mutuku S., Sharkey D., McPherson N.: MiOXSYS<sup>®</sup> and OxiSperm II assays appear to provide no clinical utility for determining oxidative stress in human sperm-results from repeated semen collections. *Andrology* 2023;11, 1566–1578.
63. Champroux A., Torres-Carreira J., Gharagozloo P., Drevet J., Kocer A.: Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl* 2016;26:17.
64. Cho C., Agarwal A.: Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol* 2018;16:21–34.
65. Cicek O., Kaya G., Alyuruk B., Doger E., Girisen T., Filiz S.: The association of seminal oxidation reduction potential with sperm parameters in patients with unexplained and male factor infertility. *Int Braz J Urol* 2021;47:112-119.
66. Cissen M., Wely M., Scholten I., Mansell S., de Bruin J., Mol B., et al.: Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016;11:1-23.
67. Corsini C., Boeri L., Candela L., Pozzi E., Beladelli F., Capogrosso P., et al.: Is There a Relevant Clinical Impact in Differentiating Idiopathic versus Unexplained Male Infertility?. *The world journal of men's health*, 2023;41,354–362.
68. Deluao J., Winstanley Y., Robker R., Pacella-Ince L., Gonzalez M., McPherson N.: Oxidative Stress and Reproductive function: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. *Reproduction* 2022;164:1470-1626.
69. DeVilbiss E., Sjaarda L., Peterson C., Hotaling J., Mills J., Mendola P. et al.: Longitudinal semen parameter assessments and live birth: variability and implications for treatment strategies. *Fertility and sterility* 2022; 118, 852–863.
70. Douglas C., Parekh N., Kahn L., Henkel R., Agarwal A.: A Novel Approach to Improving the Reliability of Manual Semen Analysis: A Paradigm Shift in the Workup of Infertile Men. *The world journal of men's health* 2021;39,172–185.
71. Dutta S., Majzoub A., Agarwal A.: Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol* 2019;17:87–97.
72. Dutta S., Sengupta P., Roychoudhury S., Chakravarthi S., Wang C., Slama P.: Antioxidant Paradox in Male Infertility: 'A Blind Eye' on Inflammation. *Antioxidants (Basel)* 2022;11:167.
73. Dutta S.; Sengupta P; Slama P; Roychoudhury S.: Oxidative Stress, Testicular Inflammatory Pathways, and Male Reproduction. *Int. J. Mol. Sci* 2021,22,10043.
74. Elbardisi H., Finelli R., Agarwal A., Majzoub A., Henkel R., Arafa M.: Predictive value of oxidative stress testing in semen for sperm DNA fragmentation assessed by sperm chromatin dispersion test. *Andrology* 2020;8:610-617.
75. Esteves S., Agarwal A., Cho C., Majzoub A.: Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats (SWOT) analysis on the clinical utility of sperm DNA fragmentation testing in specific male infertility scenarios. *Transl Androl Urol*. 2017;6:734-760.
76. Esteves S., Roque M., Garrido N.: Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: a SWOT analysis. *Asian J Androl* 2018;20:1-8.
77. Esteves S., Zini A., Coward R., Evenson D., Gosálvez J., Lewis, S.: Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia* 2021;53,1-41.
78. Esteves S.: Interventions to Prevent Sperm DNA Damage Effects on Reproduction. W Parrekattil S., et al.: Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, *Andrology Art and Antioxidants* 2019; s. 119-148. ISBN: 978-3-030-32300-4.
79. Evans E., Scholten J., Mzyk A., Reyes-San-Martin C., Llumbet A., Hamoh T., et al: Male

- subfertility and oxidative stress. *Redox biology* 2021;46,102071.
80. Evenson D.: Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Transl Androl Urol* 2017;6:495–500.
  81. Evgeni E., Charalabopoulos K., Asimakopoulos B.: Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*. 2014;15(1):2–14.
  82. Farkouh A., Salvio G., Kuroda S., Saleh R., Vogiatzi P., Agarwal A.: Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians. *Translational andrology and urology* 2022;11, 1023-1044.
  83. Finelli R., Leisegang K., Kandil H., Agarwal A.: Oxidative Stress: A Comprehensive Review of Biochemical, Molecular, and Genetic Aspects in the Pathogenesis and Management of Varicocele. *World J Mens Health*. 2022;40:87-103.
  84. Frączek M., Kurpisz M.: Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: Potential inflammatory markers in semen. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015, 53, 201–217.
  85. Frączek M., Kurpisz, M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw* 2005;59, 523–534.
  86. Francis S., Yelumalai S., Jones C., Coward K.: Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camb)* 2014;17:80-89.
  87. Gacko M., Worowska A., Karwowska A., Łapiński R.: Zewnętrzna ściana naczyń krwionośnych. *Adv Clin Exp Med* 2006;15,925-932.
  88. Gałęcka E., Jacewicz R., Mrowicka M., Florowski A., Gałęcki P.: Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje. *Pol. Merk. Lek* 2008;25:266-268.
  89. García-Rodríguez A., Gosálvez J., Agarwal A., Roy R., Johnston S.: DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *Int J Mol Sci* 2019;20:31.
  90. Gavrieliouk D., Aitken R.: Damage to Sperm DNA Mediated by Reactive Oxygen Species: Its Impact on Human Reproduction and the Health Trajectory of Offspring. *Adv Exp Med Biol* 2015;868:23-47.
  91. Gill K., Jakubik J., Rosiak-Gill A., Kups M., Lukaszuk M., Kurpisz M., et al.: Utility and Predictive Value of Human Standard Semen Parameters and Sperm DNA Dispersion for Fertility Potential. *International journal of environmental research and public health* 2019a;16, 2004.
  92. Gill K., Kups M., Harasny P., Machałowski T., Grabowska M., Lukaszuk M., et al.: The Negative Impact of Varicocele on Basic Semen Parameters, Sperm Nuclear DNA Dispersion and Oxidation-Reduction Potential in Semen. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:5977.
  93. Gill K., Machałowski T., Harasny P., Kups M., Grabowska M., Duchnik E., et al.: Male Infertility Coexists with Decreased Sperm Genomic Integrity and Oxidative Stress in Semen Irrespective of Leukocytospermia. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11:1-16.
  94. Gill K., Rosiak-Gill A., Jakubik J., Patorski L., Lukaszuk M., Piasecka M.: The higher risk for sperm DNA damage in infertile men. *Ginekologia polska*, 2019b;90,684–691.
  95. Giwercman A., Lindstedt L., Larsson M., Bungum M., Spano M., Levine R. J., et al.: Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *International journal of andrology* 2010;33: 221-227.
  96. Gold H., Jung Y., Corces V.: Not just heads and tails: The complexity of the sperm epigenome. *The Journal of biological chemistry* 2018;293,13815–13820.
  97. Grunewald S., Fitzl G., Springsguth C.: Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm. *Asian J Androl* 2017;19:533-537.
  98. Gunes S., Al-Sadaan M., Agarwal A.: Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2015;31:309-319.
  99. Gupta S., Finelli R., Agarwal A., Henkel R.: Total antioxidant capacity-Relevance, methods and clinical implications. *Andrologia* 2021;53:13624.
  100. Gutowicz M.: Mechanizmy antyoksydacyjne i detoksykacyjne w ośrodkowym układzie nerwowym. *Postępy Hig Med Dosw* 2020;74:1-11.
  101. Haddock L., Gordon S., Lewis S., Larsen P., Shehata A., Shehata H.: Sperm DNA fragmentation is a novel biomarker for early pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2021;42:175-184.
  102. Handy D., Loscalzo J.: The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med* 2022;188:146-161.
  103. Hao S., Ni F., Yang, W.: The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 2019;706,201–210.
  104. He Y., Zou L., Luo W., Yi Z., Yang P., Yu S., et al.: Heavy metal exposure, oxidative stress and semen quality: Exploring associations and mediation effects in reproductive-aged men. *Chemosphere* 2020;244:125498.
  105. Henkel R., Morris A., Vogiatzi P., Saleh R., Sallam H., et al.: Predictive value of seminal oxidation-reduction potential analysis for reproductive outcomes of ICSI. *Reproductive biomedicine online* 2022,45,1007-1020.
  106. Henkel R., Sandhu I., Agarwal A.: The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility?. *Andrologia* 2019;51:1-8.

107. Houston B., Curry B., Aitken R.: Human spermatozoa possess an IL4I1 l-amino acid oxidase with a potential role in sperm function. *Reproduction* 2015;149:587-596.
108. Humaidan P., Haahr T., Povlsen B., Kofod L., Laursen R., Alsbjerg, B., et al.: The combined effect of lifestyle intervention and antioxidant therapy on sperm DNA fragmentation and seminal oxidative stress in IVF patients: a pilot study. *International braz J urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 2022;48, 131-156.
109. Hussain T., Kandeel M., Metwally E., Ghulam M., Dildar H., Yulong Y., et al.: Unraveling the harmful effect of oxidative stress on male fertility: A mechanistic insight. *Front Endocrinol* 2023;14:1070692.
110. Jakubik-Uljasz J., Gill K., Rosiak-Gill A., Piasecka M.: Relationship between sperm morphology and sperm DNA dispersion. *Translational andrology and urology*, 2020;9,405-415.
111. Javed A., Talkad M., Ramaiah M.: Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clinical and experimental reproductive medicine* 2019; 46, 14-21.
112. Jelezarsky L., Vaisberg C., Chaushev T., Sapundjiev E.: Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology* 2008;69:139-145.
113. Jerre E., Bungum M., Evenson D., Giwercman A.: Sperm chromatin structure assay high DNA stainability sperm as a marker of early miscarriage after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril* 2019;112:46-53.
114. Joao F., Duval C., Bélanger M., Lamoureux J., Xiao C., Ates S., et al.: Reassessing the interpretation of oxidation-reduction potential in male infertility. *Reproduction & fertility* 2022;3,67-76.
115. Juárez-Rojas L., Casillas F., López A., Betancourt M., Ommati M., Retana-Márquez S.: Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa. *Andrologia* 2022;54:1-16.
116. Kaltsas A., Moustakli E., Zikopoulos A., Georgiou I., Dimitriadis F., Symeonidis E., et al.: Impact of Advanced Paternal Age on Fertility and Risks of Genetic Disorders in Offspring. *Genes* 2023;14,486.
117. Karabulut S., Korkmaz O., Yilmaz E., Keskin I.: Seminal oxidation-reduction potential as a possible indicator of impaired sperm parameters in Turkish population. *Andrologia* 2021;53:1-6.
118. Khatun A., Rahman M., Pan M.: Clinical assessment of the male fertility. *Obstet Gynecol Sci* 2018;61:179-191.
119. Kocur O., Xie P., Cheung S., Souness S., McKnight M., Rosenwaks Z., et al.: Can a sperm selection technique improve embryo ploidy?. *Andrology* 8;11,1605-1612.
120. Kotzbach R.: Epidemiologia niepłodności męskiej. W: Słowikowska-Hilczer i wsp., Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii. Warszawa; Wyd. Lekarskie PZWL; 2021; s. 471-478. ISBN 978-83-200-6066-9.
121. Kumar N., Singh A.: Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2018;47:565-572.
122. Kuroda S., Karna K., Kaiyal R., Cannarella R., Lundy S., Vij S., et al.: Novel sperm chromatin dispersion test with artificial intelligence-aided halo evaluation: A comparison study with existing modalities. *Andrology* 2023;10;1-12.
123. Llavenera M., Delgado-Bermúdez A., Olives S., Mateo-Otero Y., Recuero S., Bonet S., et al.: Glutathione S-Transferases Play a Crucial Role in Mitochondrial Function, Plasma Membrane Stability and Oxidative Regulation of Mammalian Sperm. *Antioxidants (Basel)* 2020;9:100.
124. Łuczaj W., Skrzydlewska E.: Współczesne spojrzenie na peroksydację lipidów. *Postępy Biochemii* 2006;52; 173-179.
125. Luo Z., Yao J., Xu J.: Reactive oxygen and nitrogen species regulate porcine embryo development during pre-implantation period: A mini-review. *Anim Nutr* 2021;7:823-828.
126. Machałowski T., Gill K., Piasecka M.: Udział czynnika męskiego w poronieniach. *Post. Androl Online* 2020;2: 26 – 52.
127. Majzoub A., Agarwal A., Esteves S.: Clinical utility of sperm DNA damage in male infertility. *Panminerva Me* 2019;61:118-127.
128. Majzoub A., Agarwal A.: Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. *Arab J Urol* 2018;16:113-124.
129. Majzoub A., Arafa M., Mahdi M., Agarwal A., Al Saidi S., Al-Emaidi I., et al.: Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab J Urol* 2018;16:87-95.
130. Majzoub A., Arafa, M., El Ansari, W., Mahdi, M., Agarwal, A., Al-Said, et al.: Correlation of oxidation reduction potential and total motile sperm count: its utility in the evaluation of male fertility potential. *Asian journal of andrology* 2020;22:317-322.
131. Mancini A., Oliva A., Vergani E., Festa R., Silvestrini A.: The Dual Role of Oxidants in Male (In) fertility: Every ROSe Has a Thorn. *International journal of molecular sciences* 2023;24,4994.
132. Mangiarini A., Paffoni A., Restelli L., Ferrari S., Guarneri C., Ragni G., et al.: Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoosper-

- mic and teratozoospermic subjects. *Andrology* 2013;1,838–844.
133. Mannucci A., Argento F., Fini E., Coccia M., Taddei N., Becatini M., et al.: The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. *Front Mol Biosci* 2022;8:1-9.
  134. Marchewka Z., Piwowar A., Ruzik S., Długosz A.: Transferazy glutationowe klasy Pi i Mi i ich znaczenie w onkologii. *Postępy Hig Med Dos* 2017;71:541-550.
  135. Marchlewicz M., Szypulska-Koziarska D., Grzegorzółka A., Kruk J., Duchnik E., Wiszniewska B.: Ochrona przed stresem oksydacyjnym w męskim układzie płciowym. *Pomeranian J Life Sci* 2016;62:44-52.
  136. Marinaro J., Schlegel P.: Sperm DNA Damage and Its Relevance in Fertility Treatment: A Review of Recent Literature and Current Practice Guidelines. *Int J Mol Sci* 2023;24:1446.
  137. Martin-Hidalgo D., Bragado M., Batista A., Oliveira P., Alves M.: Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants (Basel)* 2019;8:1-21.
  138. Martins A., Agarwal A.: Oxidation reduction potential: a new biomarker of male infertility. *Panminerva Med* 2019;61:108-117.
  139. Mazat J.-P., Devin A., Ransac S.: Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cell Mol Life Sci* 2020;77:455-465.
  140. McQueen D., Zhang J., Robins J.: Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril* 2019;112:54-60.
  141. Meseguer M., Martínez-Conejero J., Muriel L., Pellicer A., Remohí J., Garrido N.: The human sperm glutathione system: a key role in male fertility and successful cryopreservation. *Drug Metab Lett* 2007;1:121-126.
  142. Nadjarzadeh A., Shidfar F., Amirjannati N., Vafa M., Motevalian S., Gohari M., et al.: Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. *Andrologia* 2014;46:177-183.
  143. Nago M., Arichi A., Omura N., Iwashita Y., Kawamura T., Yumura Y.: Aging increases oxidative stress in semen. *Investig Clin Urol* 2021;62:233-238.
  144. Nandi A., Yan L., Jana C., Das N.: Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019;96:1-19.
  145. Neto F., Bach P., Najari B., Li P., Goldstein M.: Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep* 2016;17:70.
  146. Newman H., Catt S., Vining B., Vollenhoven B., Horta F.: DNA repair and response to sperm DNA damage in oocytes and embryos, and the potential consequences in ART: a systematic review. *Mol Hum Reprod* 2022;28:1-14.
  147. Nguyen N., Le M., Dang H., Van Nguyen T., Nguyen Q., Cao T.: Impact of semen oxidative stress on sperm quality: initial results from Vietnam. *The Journal of international medical research* 2023;51,1-12.
  148. O'Flaherty C., Scarlata E.: OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: The protection of mammalian spermatozoa against oxidative stress. *Reproduction* 2022;164:67-78.
  149. Okada Y.: Sperm chromatin condensation: epigenetic mechanisms to compact the genome and spatiotemporal regulation from inside and outside the nucleus. *Genes Genet Syst* 2022a;97:41-53.
  150. Okada Y.: Sperm chromatin structure: Insights from in vitro to in situ experiments. *Curr Opin Cell Biol* 2022b;75:102075.
  151. Oszukowska E.: Badanie andrologiczne podmiotowe i przedmiotowe. W: Słowikowska-Hilczer i wsp., *Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii*. Warszawa; Wyd. Lekarskie PZWL; 2021; s. 311-318. ISBN 978-83-200-6066-9.
  152. Otasevic V., Stancic A., Korac A., Jankovic A., Korac B.: Reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species in human male fertility. A crossroad of cellular signaling and pathology. *Biofactors* 2020;46:206-219.
  153. Ou Z., Wen Q., Deng Y., Yu Y., Chen Z., Sun L.: Cigarette smoking is associated with high level of ferroptosis in seminal plasma and affects semen quality. *Reproductive biology and endocrinology* 2020;18,55.
  154. Oumaima A., Tesnim A., Zohra H., Amira S., Ines Z., Sana C.: Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation. *Environmental science and pollution research international* 2018;25,13775–13786.
  155. Pan M., Hockenberry M., Kirby E., Lipshultz L.: Male Infertility Diagnosis and Treatment in the Era of In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Med Clin North Am* 2018;102:337–347.
  156. Panday A., Sahoo M., Osorio D., Batra S.: NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol* 2015;12:5-23.
  157. Panner Selvam M. K., Agarwal A., Henkel R., Finelli R., Robert K. A., Iovine C., et al.: The effect of oxidative and reductive stress on semen parameters and functions of physiologically normal human spermatozoa. *Free radical biology & medicine* 2020;152,375–385.
  158. Panner Selvam M. K., Finelli R., Agarwal A., Henkel R.: Evaluation of seminal oxidation-reduction potential in male infertility. *Andrologia* 2021b;53:1-9.
  159. Panner Selvam M.K., Agarwal A.: A systematic review on sperm DNA fragmentation

- in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab J Urol* 2018;17:65-76.
160. Panner Selvam M.K., Ambar R., Agarwal A., Henkel R.: Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia* 2021a;53:1-15.
  161. Panner Selvam M.K., Baskaran S., O'Connell S., Almajed W., Hellstrom W., Sikka S.: Association between Seminal Oxidation-Reduction Potential and Sperm DNA Fragmentation—A Meta-Analysis. *Antioxidants* 2022, 11, 1563.
  162. Piasecka M., Gill K., Walczak-Jędrzejowska R.: Budowa plemnika. W: Słowikowska-Hilcz J.: *Andrologia Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii*. 2021; Wyd I. s. 225-260. ISBN 978-83-200-6066-9.
  163. Pino V., Sanz A., Valdés N., Crosby J., Mackenna A.: The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA Assist Reprod* 2020;24:82-86.
  164. Podgornaya O.: Nuclear organization by satellite DNA, SAF-A/hnRNP and matrix attachment regions. *Semin Cell Dev Biol* 2022;128: 61-68.
  165. Poetsch A.: The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;18:207-219.
  166. Puglisi R., Tramer F., Carlomagno G., Gandini L., Panfili E., et al.: PHGPx in spermatogenesis: how many functions?. *Contraception* 2005;72:291-293.
  167. Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M.: Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol* 2010; 43:9-14.
  168. Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L.: Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol* 2008; 41; 1007-1015.
  169. Rana M., Agarwal A.: Seminal Oxidation-Reduction Potential. W Parrekattil S., et al.: *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, Art and Antioxidants*. Springer, 2021; s. 377-387. ISBN: 978-3-030-32300-4.
  170. Rashki Ghaleño L., Alizadeh A., Drevet J., Shahverdi A., Valojerdi M.: Oxidation of Sperm DNA and Male Infertility. *Antioxidants* 2021;10:97.
  171. Ribas-Maynou J., García-Peiró A., Fernandez-Encinas A., Amengual M. J., Prada E., Cortés P., et al.: Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS one* 2012;7:1-9.
  172. Ribas-Maynou J., Nguyen H., Wu H., Ward W.: Functional Aspects of Sperm Chromatin Organization. *Results Probl Cell Differ* 2022;70: 295-311.
  173. Ritchie C., Ko E.: Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. *Andrologia* 2021;53:1-11.
  174. Ronquist G. Prostatosomes: Their Characterisation: Implications for Human Reproduction. W: *Prostatosomes and Human Reproduction. Adv Exp Med Biol* 2015;868:191-209.
  175. Sakkas D., Alvarez J.: Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility* 2010;93:1027–1036.
  176. Salonia A., Bettocchi C., Capogrosso P., Carvalho J., Corona G., Hatzichristodoulou G., et al.: EAU Guidelines on Sexual and Reproductive Health 2023. In: *European Association of Urology Guidelines. 2023 Edition presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2020*. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology Guidelines Office, 2023.
  177. Santi D., Spaggiari G., Simoni M.: Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. *Reproductive biomedicine online* 2018;37, 315–326.
  178. Sarniak A., Lipińska J., Tytman K., Lipińska S.: Endogenne mechanizmy powstawania reaktywnych form tlenu (ROS). *Postepy Hig Med Dosw* 2016;70:1150-1164.
  179. Sharma P., Kaushal N., Saleth L., Ghavami S., Dhingra S., Kaur P.: Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: Balancing the contrary forces in spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2023;1869:166742.
  180. Sheweita S., El-Dafrawi Y., El-Ghalid O., Ghoneim A., Wahid A.: Antioxidants (selenium and garlic) alleviated the adverse effects of tramadol on the reproductive system and oxidative stress markers in male rabbits. *Sci Rep* 2022;12:1-12.
  181. Shi H., Liu J., Zhu P., Wang H., Zhao Z., Sun G., et al.: Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H2O2-induced damage to spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 2018;56:141-150.
  182. Siddiqui T., Zia M., Ali S., Rehman A., Ahsan H, Khan F.: Reactive oxygen species and anti-proteinases. *Arch Physiol Biochem* 2016; 122:1-7.
  183. Sies H.: Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel)* 2020;9:852.
  184. Simon L, Emery B., Carrell D.: Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;44:38–56.
  185. Singh A., Agarwal A.: The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. *The open reproductive science journal* 2011;3:65-71.
  186. Słowikowska-Hilcz J.: Klasyfikacja niepłodności i strategia postępowania u niepłodnej pary. W: *Słowikowska-Hilcz i wsp., Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii*.

- gii. Warszawa; Wyd. Lekarskie PZWL; 2021; s. 479-488. ISBN 978-83-200-6066-9.
187. Su L., Zhang J., Gomez H., Murugan R., Hong X., Xu D., et al.: Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019;5080843:1-13.
  188. Sun T., Li D., Yu H., Song L., Jia Y., Lin L., et al.: Bilateral varicocele leads to ferroptosis, pyroptosis and necroptosis of human spermatozoa and affects semen quality in infertile men. *Frontiers in cell and developmental biology* 2023;11,1-11.
  189. Takalani N., Monageng E., Mohlala K., Monsees T., Henkel R., Opuwari C.: Role of oxidative stress in male infertility. *Reprod Fertil* 2023;4:1-15.
  190. Takeshima T., Usui K., Mori K., et al.: Oxidative stress and male infertility. *Reprod Med Biol* 2021;20:41-52.
  191. Talebi A., Fesahat F., Mangoli E., Ghasemzadeh J., Nayeri M., Sadeghian-Nodoshan F.: Relationship between sperm protamine deficiency and apoptosis in couples with unexplained repeated spontaneous abortions. *International journal of reproductive biomedicine* 2016;14,199-204.
  192. Tanaka T., Kobori Y., Terai K., Inoue Y., Osaka A., Yoshikawa N., et al.: Seminal oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation index increase among infertile men with varicocele. *Hum Fertil* 2022;25:142-146.
  193. Vassiliou A., Martin C., Homa S., Stone J., Dawkins J., Genkova M., et al.: Redox potential in human semen: Validation and qualification of the MiOX<sup>sys</sup> assay. *Andrologia* 2021;53:1-9.
  194. Vickram A., Anbarasu K., Gulothungan G., Thanigaivel S., Nanmaran R., Palanivelu J.: Characterization of human prostasomes protein Clusterin (macromolecule) - a novel biomarker for male infertility diagnosis and prognosis. *J Biomol Struct Dyn* 2022;40:3979-3988.
  195. Vickram A., Samad H., Latheef S., Chakraborty S., Dhama K., Sridharan T., et al.: Human prostasomes an extracellular vesicle - Biomarkers for male infertility and prostate cancer: The journey from identification to current knowledge. *Int J Biol Macromol* 2020;146:946-958.
  196. Walczak-Jedrzejowska R., Wolski J., Slowikowska-Hilczner J.: The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol* 2013;66:60-67.
  197. Walczak-Jedrzejowska R.: Nowe szóste wydanie rekomendacji WHO z 2021 roku dotyczące badania nasienia – jakie zmiany i nowości dla laboratoriów seminologicznych? *Post. Androl Online* 2022;9:6-25.
  198. Walczak-Jedrzejowska R.: Stres oksydacyjny a niepłodność męska. Część I: Czynniki wywołujące stres oksydacyjny w nasieniu. Oxidative Stress and Male Infertility. Part I: Factors Causing Oxidative Stress in Semen. *Post Androl Online* 2015;2:5-15.
  199. Walke G., Gaurkar S., Prasad R., Lohakare T., Wanjari M.: The Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function: Exploring the Role of Antioxidant Supplementation. *Cureus* 2023;15:1-13.
  200. Walters J., Anderson A., Martins da Silva S., Aitken R., De Iulius G., Sutherland J., et al.: Mechanistic Insight into the Regulation of Lipoxygenase-Driven Lipid Peroxidation Events in Human Spermatozoa and Their Impact on Male Fertility. *Antioxidants* 2021;10:1-17.
  201. Walters J., De Iulius G., Dun M.: Pharmacological inhibition of arachidonate 15-lipoxygenase protects human spermatozoa against oxidative stress. *Biol Reprod* 2018a;98:784-794.
  202. Walters J., De Iulius G., Nixon B., Bromfield E.: Oxidative Stress in the Male Germ-line: A Review of Novel Strategies to Reduce 4-Hydroxynonenal Production. *Antioxidants* 2018b;7:1-15.
  203. Wang B., Wang Y., Zhang J., Hu C., Jiang J., Li Y., et al.: ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Arch Toxicol.* 2023;97:1439-1451.
  204. Wang Q., Gu X., Chen Y., Chen Y., Yu M., Peng L., Zhong S., et al.: The effect of sperm DNA fragmentation on in vitro fertilization outcomes of unexplained infertility. *Clinics* 2023;78:1-6.
  205. Watanabe S.: DNA damage in human sperm: The sperm chromosome assay. *Reprod Med Biol* 2022;21:1-13.
  206. Wei G., Zhou Z., Cui Y., Huang Y., Wan Z., Che X., et al.: A Meta-Analysis of the Efficacy of L-Carnitine/L-Acetyl-Carnitine or N-Acetyl-Cysteine in Men With Idiopathic Asthenozoospermia. *American journal of men's health* 2021;15:1-11.
  207. Williams R., Harvey J., Budhathoki-Uprety J., Heller D.: Glutathione-S-transferase Fusion Protein Nanosensor. *Nano Lett* 2020;20:7287-7295.
  208. Wiweko B., Utami P.: Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility. *Basic Clin Androl* 2017;27:1.
  209. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th ed.; World Health Organization Press: Geneva, Switzerland, 2021.
  210. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed.; World Health Organization Press: Geneva, Switzerland, 2010.
  211. Xu Q., Xie W.: Epigenome in Early Mammalian Development: Inheritance, Reprogramming and Establishment. *Trends Cell Biol* 2018;28:237-253.

212. Yamasaki K., Uchida M., Watanabe N., Ihana T., Ishiguro Y., Kuroda S., et al.: Effects of anti-oxidant co-supplementation therapy on spermatogenesis dysfunction in relation to the basal oxidation-reduction potential levels in spermatozoa: A pilot study. *Reprod Med Biol* 2022;21:1-10.
213. Yang B., Chen Y., Shi J.: Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem Rev* 2019;24:4881-4985.
214. Zaha I., Muresan M., Tulcan C., Huniadi A., Naghi P., Sandor M., et al.: The Role of Oxidative Stress in Infertility. *Journal of personalized medicine* 2023;13:1-13.
215. Zandieh Z., Vatannejad A., Doosti M., Zabihzadeh S., Haddadi M., Bajelan L., et al.: Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. *Irish journal of medical science* 2018;187:657-662.
216. Zargari F., Rahaman M., KazemPour R., Hajirostamlou M.: Arsenic, Oxidative Stress and Reproductive System. *J Xenobiot* 2022;12:214-222.
217. Zhang H., Liu H., Kataoka S., Kinukawa M., Uchiyama K., Kambe J., et al.: L-amino acid oxidase 1 in sperm is associated with reproductive performance in male mice and bulls. *Biol Reprod* 2021;104:1154-1161.
218. Zhao J., Dong X., Hu X., Long Z., Wang L., Liu Q., et al.: Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:1-10.
219. Zheng W.W., Song G., Wang Q.L.: Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian J Androl* 2018;20:75-79.



## 10. ANEKS – NOTA BIOGRAFICZNA DOKTORANTA



Urodzony 09.11.1993 r. w Szczecinie. Absolwent IX Liceum Ogólnokształcącego im. Bohaterów Monte Cassino w Szczecinie. Studia na kierunku lekarskim na Wydziale Lekarskim Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM) w latach 2012–2018 r. Od 2019 r. Doktorant Szkoły Doktorskiej w Zakładzie Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie. Od 12.2019 r. lekarz rezydent położnictwa i ginekologii w Klinice Perinatologii, Położnictwa i Ginekologii PUM Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 1 w Szczecinie przy ul. Unii Lubelskiej 1 (od 01.2024 r. Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 1)

oraz Przychodni Medycznej PRAMED. Od 02.2024 r. zatrudniony na stanowisku Asystenta Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Autor i współautor licznych publikacji w recenzowanych czasopismach naukowych oraz doniesień zjazdowych na konferencjach krajowych i zagranicznych o **sumarycznym Impact Factor = 20,114 i 619 punktów MNiSW**. Tematyka opublikowanych artykułów dotyczy w większości niepłodności męskiej i oceny podstawowych i zaawansowanych parametrów męskich komórek rozrodczych. Członek Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników, Polskiego Towarzystwa Andrologicznego oraz Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii. Uczestnik wymian naukowych w renomowanych Uniwersytetach, m.in. w Japonii, Niemczech i Tajlandii.

### Publikacje na podstawie analizy bibliometrycznej wykazanej przez Bibliotekę PUM na dzień 27.02.2024 r.

	Łączna liczba prac	Liczba prac z Impact Factor	Liczba prac z pkt MNiSW	Łączna wartość IF	Łączna wartość pkt MNiSW
OGÓLEM	29	4	9	20,114	619
Artykuł polski	4	0	4	0	29
Artykuł zagraniczny	5	4	5	20,114	590
Streszczenie zjazdowe polskie	15	0	0	0	0
Streszczenie zjazdowe zagraniczne	5	0	0	0	0

### Autor i współautor publikacji w recenzowanych czasopismach polskich i zagranicznych:

1. Gill K., Machałowski T., Harasny P., Kups M., Grabowska M., Duchnik E., et al.: Male infertility coexists with decreased sperm genomic integrity and oxidative stress in semen irrespective of leukocytospermia. *Antioxidants* 2022; 11:1-18. Impact Factor 7,000, punkty MNiSW 100.
2. Gill K., Machałowski T., Harasny P., Grabowska M., Duchnik E., Piasecka M.: Male Infertility Coexists with Decreased Sperm Genomic Integrity and Oxidative Stress in Semen Irrespective of Leukocytospermia. *Antioxidants (Basel)* 2022;11:1987. Impact Factor 4,600, punkty MNiSW 140.
3. Gill K., Kups M., Harasny P., Machałowski T., Grabowska M., Łukaszuk M., et al.: The negative impact of varicocele on basic semen parameters, sperm nuclear DNA dispersion and oxidation-reduction potential in semen. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021; 18:11. Impact Factor 4,614, punkty MNiSW 140.
4. Ziętek M., Szczuko M., Machałowski T.: Gastrointestinal disorders and atopic dermatitis in infants in the first year of life according to ROME IV criteria - a possible association with the mode of delivery and early life nutrition. *J. Clin. Med.* 2024;13:1-13. Impact Factor 3,900, punkty MNiSW 140.

5. Kups M., Gill K., Rosiak-Gill A., Harasny P., **Machałowski T.**, Grabowska M., et al.: Evaluation of selected semen parameters and biomarkers of male infertility - preliminary study. *F1000Res.* 2022;11:591. Punkty MNiSW 70.
6. **Machałowski T.**, Gill K., Piasecka M.: Udział czynnika męskiego w poronieniach nawracających. *Post. Androl. Online* 2020;7:26-52. Punkty MNiSW 5.
7. Gill K., **Machałowski T.**, Piasecka K., Harasny P., Piasecka M.: Wpływ statusu chromatyny plemników ludzkich na wyniki rozrodu w warunkach in vitro. *Post. Androl. Online* 2020;7:6-25. Punkty MNiSW 5.
8. **Machałowski T.**, Młyńczyk J., Piskozub M., Niedzielska K., Krzywińska-Zdeb E., Piotrowska-Depta M.: Childhood overweight and obesity analysis of the risk factors, including the patients family's lifestyle, based on research results collected from two academic centres in Poland. *Pediatr. Pol.* 2018; 93:383-388. Punkty MNiSW 15.
9. **Machałowski T.**, Daban A., Tivic N., Skoczylas M., Sawici M., Walecka A.: Anatomical disorders of genitourinary system in children with sirenomelia in diagnostic imaging = Zaburzenia anatomiczne układu moczowo-płciowego u dzieci z syrenomią w diagnostyce obrazowej. *Probl. Nauk. Stosow.* 2016;5:151-156. Punkty MNiSW 4.

#### **Autor i współautor doniesień naukowych na zjazdach krajowych i zagranicznych:**

1. Kups M., Gill K., Hasrasny P., **Machałowski T.**, Grabowska M., Kurzawa R., et al: Evaluation of selected semen parameters and biomarkers of male infertility – preliminary study. 12<sup>th</sup> European Congress of Andrology, Barcelona, 19–21 October 2022. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 77–79.
2. Gill K., Grabowska M., **Machałowski T.**, Harasny P., Marchlewicz M., Sipak O., et al.: Male infertility coexists with oxidative stress in semen and decreased sperm genomic integrity irrespective of leukocytospermia. 12<sup>th</sup> European Congress of Andrology, Barcelona, 19–21 October 2022. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 56–57.
3. Grabowska M., Michałek K., Kędzińska-Kapuza K., Gill K., **Machałowski T.**, Harasny P., et al.: Morphology of epididymis and expression of aquaporin 9 in epididymal duct of adult rats after long-term treatment with immunosuppressive protocols based on calcineurin inhibitors. 12<sup>th</sup> European Congress of Andrology, Barcelona, 19–21 October 2022. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 68.
4. Grabowska M., Michałek K., Kędzińska-Kapuza K., Gill K., **Machałowski T.**, Harasny P., et al.: The effects of different immunosuppressive therapies on rat testis morphology and testicular immunoexpression of aquaporins. 16<sup>th</sup> International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Prague, Czech Republic, 30 August 2022. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 91.
5. Grabowska M., Michałek K., Kędzińska-Kapuza K., Gill K., **Machałowski T.**, Harasny P., et al.: Wpływ schematów leczenia immunosupresyjnego opartych na rapamycynie na ekspresję akwaporyn 1, 7 i 9 w gonadzie męskiej szczura. Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym. 54 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Bydgoszcz 23–25 maj 2022 r. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 29.
6. **Machałowski T.**, Sadowa J., Piasecka M., Gill K., Jakubik-Uljasz J.: Does oxidation-reduction potential have influence for semen parameters and men fertility? 1<sup>st</sup> Virtual Festival of Life and Earth Sciences, July 20<sup>th</sup>–26<sup>th</sup>, 2020. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 2.
7. Młyńczyk J., **Machałowski T.**, Niedzielska K., Piskozub M.: Children's eating habits and physical activity in the development of obesity – a comparison between two academic centers in Poland. 13<sup>th</sup> BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, 17–19<sup>th</sup> May 2018. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 215.
8. Kowaliński M., Chwaciński M., Kuźniar A., Wieczorek Z., **Machałowski T.**: Czynniki ryzyka raka sutka. XLVIII Ogólnopolska Konferencja Studentów Uczelni Medycznych w Szczecinie; III International Medical Student's Conference, Szczecin, 16–17.03.2018. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 29.
9. Młyńczyk J., **Machałowski T.**, Piskozub M., Niedzielska K.: Development of excessive body weight in children - an analysis of data from two provincial capitals of Poland. Aktualne problemy sovremennoj

- medycyny i farmacji 2018. LXXII Meždunarodnaâ naučno-praktičeskaâ konferenciâ studentov i molodyh učënyh. Minsk, 2018. Sbornik tezisov dokladov. 2018 Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 1234.
10. **Machałowski T.**: Paget's disease of bone – pathogenesis, symptoms, diagnostics, differentiation. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. IV Konferencja, Wrocław-Szczecin, 5 i 24 kwietnia 2017. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 39.
  11. **Machałowski T.**, Daban A., Chaszczowska A., Niedzielska K., Gądek M.: Hunter syndrome and its diagnostic imaging. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. IV Konferencja, Wrocław-Szczecin, 5 i 24 kwietnia 2017. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 10.
  12. Młyńczyk J., Piskozub M., Niedzielska K., **Machałowski T.**: Overweight and obesity in children – an analysis of causative factors with regard to the family's lifestyle. Juvenes pro medicine, Łódź, 19–20 May 2017. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 97.
  13. Chaszczowska A., **Machałowski T.**, Schneider M.: Pneumoencefalografia w badaniach chorych z chorobami rzadkimi – rys historyczny. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. IV Konferencja, Wrocław-Szczecin, 5 i 24 kwietnia 2017. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 28–29.
  14. Daban A., Chaszczowska A., **Machałowski T.**, Niedzielska K., Schneider M.: Trends in paediatrics, internal medicine, diagnostic imaging and general healthcare in the field of education on rare diseases. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. IV Konferencja, Wrocław-Szczecin, 5 i 24 kwietnia 2017. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 12–14.
  15. Arcimowicz A., **Machałowski T.**: Zaburzenia beta-oksydacji kwasów tłuszczowych w praktyce lekarskiej. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. IV Konferencja, Wrocław-Szczecin, 5 i 24 kwietnia 2017. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 42–43.
  16. Arcimowicz A., **Machałowski T.**: Choroba Sandhoffa - przypadek kliniczny. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. III Konferencja, Wrocław-Szczecin, 14 i 16 maja 2016. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 25–26.
  17. Siderius L., **Machałowski T.**, Skoczylas M., Walecka A.: Sources of information about rare diseases in the service of healthcare. Ekologia człowieka. II Międzynarodowa Konferencja, Szczecin 9–10 June 2016. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 186.
  18. Chaszczowska A., Godycka-Ćwirko A., **Machałowski T.**, Skoczylas M., Sawicki M., Walecka A.: Wyrośla kości przedramienia i deformacja Madelunga w rentgenografii klasycznej u chorych z mnogimi kostniakochrzęstniakami. W: Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. III Konferencja, Wrocław-Szczecin, 14 i 16 maja 2016. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 28–29.
  19. **Machałowski T.**, Ticic N., Daban A.: Zaburzenia układu moczowo-płciowego u chorych z syrenomelią - przegląd literatury. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. III Konferencja, Wrocław-Szczecin, 14 i 16 maja 2016. Streszczenia. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 23–24.
  20. Skoczylas M., **Machałowski T.**, Odegaard P., Sawicki M.: Zaburzenia w obrębie serca, wątroby i oka w obrazie zespołu Alströma możliwe do wykrycia za pomocą metod diagnostyki obrazowej – przegląd literatury. Choroby rzadkie nie tylko w programie nauczania. II Konferencja, Szczecin-Wrocław, 26–30 maja 2015 roku. Streszczenie: materiały zjazdowe, s. 11–12.