



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

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 niewyjaśniona, 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 χ^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.