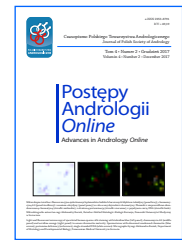




Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego

Postępy Andrologii Online

Advances in Andrology Online

<http://www.postepyandrologii.pl>

CZY ZAAWANSOWANY WIEK OJCOWSKI MA WPŁYW NA SUKCES ROZRODCZY? CZĘŚĆ I: OCENA WYBRANYCH PARAMETRÓW SEMINOLOGICZNYCH

IS ADVANCED PATERNAL AGE A REPRODUCTIVE RISK? PART I: ASSESSMENT OF SELECTED STANDARD SPERM CHARACTERISTICS

Aleksandra Rosiak^{1,5}, Kamil Gill¹, Joanna Jakubik¹, Michał Kupś^{4,5}, Łukasz Patorski^{1,3},
Rafał Kurzawa^{2,5}, Małgorzata Piasecka¹

¹Katedra i Zakład Histologii i Biologii Rozwoju; ²Zakład Zdrowia Prokreacyjnego, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie; ³Klinika Ginekologii, Endokrynologii i Onkologii Ginekologicznej, SPSK1, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie; ⁴Oddział Urologii i Onkologii Urologicznej Samodzielnego Publicznego Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego w Szczecinie; ⁵VitroLive Centrum Ginekologii i Leczenia Niepłodności w Szczecinie

Autor do korespondencji/corresponding author: Małgorzata Piasecka, Katedra i Zakład Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, 70-210 Szczecin, ul. Żołnierska 48, tel. 91 48 00 907, mpiasecka@ipartner.com.pl

Otrzymano/received: 19.11.2017 r. Zaakceptowano/accepted: 30.12.2017 r.



Aleksandra Rosiak – mgr analityki medycznej, diagnosta laboratoryjny, absolwentka i doktorantka Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM). Od 2015 r. pracownik VitroLive Centrum Ginekologii i Leczenia Niepłodności w Szczecinie, a od 2017 r. również Katedry i Zakładu Histologii i Biologii Rozwoju PUM. Współautorka prac naukowych i doniesień zjazdowych w kraju i zagranicą. Aktywnie uczestniczy w projektach naukowych. Praca zawodowa i naukowa związana jest z rozszerzeniem konwencjonalnej diagnostyki seminologicznej.

Aleksandra Rosiak – master of Medical Analytics, laboratory diagnostician, graduate of the Pomeranian Medical University in Szczecin (PUM). Currently she is PhD student at PUM. Since 2015 employed at VitroLive Fertility Clinic in Szczecin and since 2017 at Department of Histology and Developmental Biology PUM. Author and co-author of scientific publications and abstracts for national and international congresses. Actively participates in research projects. Her professional and scientific work is associated with the extension of conventional semen diagnostics.

Streszczenie

Z licznych doniesień wynika, że istotnym czynnikiem wpływającym na potencjał płodności mężczyzny jest wiek. Sugeruje się, że >40., a nawet >35. r.ż. mężczyzny (tzw. *advanced paternal age*) zwiększa się ryzyko niepowodzeń w rozrodzie. Wraz z wiekiem mężczyzny częściej pojawiają się infekcje układu moczowo-płciowego oraz choroby ogólnoustrojowe. Może dochodzić do zakłóceń czynności osi podwzgórze–przysadka–jądra mogących obniżyć funkcje seksualne oraz powodować zmiany w strukturze i funkcji jąder. Wskazuje się, że podłożem tych zmian mogą być patomechanizmy związane z zaburzeniem równowagi pro- i antyoksydacyjnej, której konsekwencją jest generowanie nadmiaru reaktywnych form tlenu powodujących niekorzystne skutki w przebiegu spermatogenezy i wzrost ryzyka

uszkodzeń ilościowych i jakościowych męskich komórek rozrodczych, w tym również molekularnych. Szczególną uwagę zwraca się na dojrzałość chromatyny plemników, która może odgrywać istotną rolę w osiągnięciu sukcesu rozrodczego, zarówno w warunkach naturalnej koncepcji, jak i wspomaganie medycznie.

Słowa kluczowe: wiek mężczyzny, płodność męska, plemniki, chromatyna plemnika

Abstract

Numerous reports indicate that the paternal age is an important factor affecting the fertility potential. The risk of reproductive failure can increase in age >40 or even >35 years in men, commonly classified as advanced age. Urogenital infections and systemic diseases appear more often with advanced paternal age. Moreover disturbances in the hypothalamic-pituitary-testis axis which may affect sexual function and cause changes in the structure and function of the testis can appear more frequently. Possible pathomechanism for age depended alterations in the male reproductive system is associated with imbalance between pro- and antioxidative processes which inevitably leads to an oxidative stress and to increase the production of reactive oxygen species. Finally, the disturbances of spermatogenesis and the higher risk of quantitative and qualitative as well as molecular abnormalities of male gametes can appear. Particular attention is paid to the maturity of sperm chromatin, which may play a key role in achieving reproductive success, both in a natural and medically assisted conception.

Key words: male age, male fertility, spermatozoa, sperm chromatin

Skróty / Abbreviations

5mC – 5-metylocytozyna (ang. *5-methylcytosine*), AB – błękit aniliny (AB, ang. *aniline blue*), ADAM – obniżenie stężenia androgenów u starzejących się mężczyzn (ang. *androgen deficiency of the aging men*), AO – oranż akrydyny (ang. *acridine orange*), CMA3 – chromomycyna A3 (ang. *chromomycin A3*), DHEA – dehydroepiandrosteron (ang. *dehydroepiandrosterone*), EMAS – europejskie badania nad starzeniem się mężczyzn (ang. *European Male Ageing Study*), FSH – hormon folikulotropowy (ang. *follicle-stimulating hormone*), FT – wolna frakcja testosteronu (ang. *free testosterone*), ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika (ang. *intracytoplasmic sperm injection*), kpz – tysiąc par zasad (ang. *kilo base pairs*), LH – hormon luteinizujący (ang. *luteinizing hormone*), LNV – plemniki z dużymi jądrowymi wakuolami (ang. *large nuclear vacuoles*), LOH – późny hipogonadyzm (ang. *late onset hypogonadism*), MMAS – badania z Massachusetts nad starzeniem się mężczyzn (ang. *Massachusetts Male Aging Study*), OAT – oligoasthenoteratozoospermia (ang. *oligoasthenoteratozoospermia*), PADAM – częściowe obniżenie stężenia androgenów u starzejących się mężczyzn (ang. *partial androgen deficiency of the aging men*), RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*), SCSA – test służący do oceny uszkodzeń DNA (ang. *sperm chromatin structure assay*), SHBG – białko wiążące hormony płciowe (ang. *sex hormone-binding globulin*), TB – błękit toluidyny (ang. *toluidine blue*), TDS – zespół niedoboru testosteronu (ang. *testosterone deficiency syndrome*), TGF- α – transformujący czynnik wzrostu α (ang. *transforming growth factor α*), TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor β*), TUNEL – znakowanie końców nacięć nici DNA przy użyciu termialnej transferazy deoksynukleotydowej (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*), TZI – indeks teratozoospermii (ang. *teratozoospermia index*)

Niektóre czynniki mające wpływ na decyzję o posiadaniu potomstwa

Małżeństwo oraz chęć założenia rodziny (posiadanie potomstwa) są silnie zakorzenione w tradycji i wartościach Polaków. Od 2008 r. notuje się jednak spadek liczby zawieranych związków małżeńskich, co jest znacząco powiązane z liczbą urodzeń. Obecnie ludzie młodzi inwestują w swoją edukację oraz rozwój zawodowy, odsuwając na dalszy plan decyzję o ustatkowaniu się i posiadaniu potomstwa. Chcą uzyskać odpowiedni status ekonomiczny, by bez wyrzeczeń utrzymać rodzinę, co przyczynia się do sukcesywnego wzrostu średniego wieku kobiet i mężczyzn wstępujących w związek małżeński. W 1990 r. mediana wieku mężczyzn wynosiła 24 lata, a w 2013 r. już 28 lat, z kolei w 2016 r. 29,5 lat. Na świecie wartość mediany wynosi 29 lat. Od 1990 r. współczynnik dzietności nie gwarantuje zastępowalności pokoleń (poniżej 2), w 2016 r. wynosił 1,357. Nic nie

wskazuje na zmianę tej tendencji w najbliższych latach (*Herati i wsp., 2017; Stańczak i wsp., 2016; Główny Urząd Statystyczny. Rocznik demograficzny, 2017*).

Nie ulega wątpliwości fakt, że późne rodzicielstwo staje się zjawiskiem socjologicznym, a decyzja o posiadaniu potomstwa uwarunkowana jest zmianami struktury zachowań ludzkich w wyniku zmian społecznych i ekonomicznych kraju. W przypadku wieku partnerki (35.–45. r.ż.) obserwuje się wzrastającą częstość pojawienia się aberracji liczbowych zarówno chromosomów płciowych (zespół Turnera, Klinefeltera, zespół Kobiety), jak i somatycznych (zespół Downa, Edwardsa, Patau) (*Luthardt i Keitge, 2001*). Z kolei wpływ wieku mężczyzny na jego potencjał płodności nie jest do końca wyjaśniony, nie istnieje bowiem konkretny okres życia, po którym mężczyzna nie będzie w stanie zostać ojcem. Dlatego też zastanawiające jest, w jakim stopniu płodność męska jest nieograniczona, czy do końca swojego życia mężczyzna może dawać początek nowemu istnieniu, jak bardzo

wraz z upływającym czasem osłabiają się jego możliwości, a także jakie są konsekwencje późnego ojcostwa. Badacze poszukują wartości dla tzw. *advanced paternal age*, powyżej której zwiększa się ryzyko niepowodzeń w rozrodcie. Sugeruje się, że wartością graniczną może być ukończony przez mężczyznę 35. lub 40. r.ż. (*Belloc i wsp.*, 2014b; *Dubov i wsp.*, 2016; *Harris i wsp.*, 2017; *Jennings i wsp.*, 2017; *Nybo-Andersen i wsp.*, 2017; *Priskorn i wsp.*, 2014; *Ramasamy i wsp.*, 2015; *Sharma i wsp.*, 2015; *Sigman*, 2017; *Stone i wsp.*, 2013; *Urhoj i wsp.*, 2017a, 2017b; *Vierck i Silverman*, 2015).

■ Gospodarka hormonalna

Jednym z czynników odpowiadających za prawidłową funkcję męskiego układu płciowego jest sprawne działanie układu podwzgórze–przysadka–gonada. Wraz z wiekiem mężczyzny dochodzi do zmian biomarkerów hormonalnych. Według *Gray i wsp.* (1991) co roku średnio o 1,9% wzrasta stężenie hormonu folikulotropowego (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*), o 1,3% wzrasta poziom hormonu luteinizującego (LH, ang. *luteinizing hormone*), o 0,4% obniża się stężenie całkowitego testosteronu oraz o 1,2% jego wolnej frakcji (FT, ang. *free testosterone*). Co roku dochodzi również do wzrostu o 1,2% stężenia białka wiążącego hormony płciowe (SHBG, ang. *sex hormone-binding globulin*) w surowicy krwi, co według badaczy i klinicystów prowadzi do spadku libido oraz zmniejszenia częstości stosunków seksualnych (*Eisenberg i Meldrum*, 2017; *Gray i wsp.*, 1991; *Gunes i wsp.*, 2016; *Ramasamy i wsp.*, 2015; *Sharma i wsp.*, 2015). Zmiany stężeń hormonów zostały częściowo potwierdzone prospektywnymi badaniami klinicznymi EMAS (ang. *European Male Ageing Study*) (*Wu i wsp.*, 2010) oraz MMAS (ang. *Massachusetts Male Aging Study*) (*Cabral i wsp.*, 2014) dotyczącymi starzenia się mężczyzn. Obserwuje się również obniżenie produkcji estrogenów pełniących funkcje regulatorowe (*Gunes i wsp.*, 2016). Po raz pierwszy, w 2006 r., do opisanie tych zmian, czyli wtórnego hipogonadyzmu, użyto terminu LOH (ang. *late onset hypogonadism*, późny hipogonadizm) (*Nieschlag i wsp.*, 2006), w piśmiennictwie anglojęzycznym używa się również nazw ADAM (ang. *androgen deficiency of the aging men*, obniżenie stężenia androgenów u starzejących się mężczyzn), PADAM (ang. *partial androgen deficiency of the aging men*, częściowe obniżenie stężenia androgenów u starzejących się mężczyzn) oraz TDS (ang. *testosterone deficiency syndrome*, zespół niedoboru testosteronu) (*Gomuła i Rabijewski*, 2010; *Kula i wsp.*, 2015; *Morales i Lunenfeld*, 2002; *Wang i wsp.*, 2009). Do rozpoznania tej jednostki chorobowej niezbędne jest stwierdzenie co najmniej 3 objawów klinicznych (m.in. uczucia zmęczenia, braku energii, ospałości, obniżenia libido, drażliwości, zwiększenia masy ciała, zmniejszenia masy mięśniowej i kostnej) oraz obniżenia stężenia testosteronu we krwi <12 nmol/L (<3,5 ng/mL) u mężczyzn >40. r.ż. (*Jiann*, 2017; *Kula i Słowikowska-Hilczer*, 2012; *Kula i wsp.*, 2015; *Wu i wsp.*, 2010).

■ Obraz histologiczny męskiej gonady

Jądro jest organem parzystym o specyficznej oraz skomplikowanej budowie. Odpowiada za produkcję plemników (spermatogeneza) oraz wydzielanie męskich hormonów płciowych (steroidogeneza). Na poprawną czynność jądra wpływa zarówno prawidłowa organizacja tkanki interstycjalnej, jego unerwienie, unaczynienie, jak i zachowanie nienaruszonej bariery krew–jądro (*Bilińska i wsp.*, 2013; *Kopera-Sobota i wsp.*, 2013; *Kotula-Balak i wsp.*, 2013; *Łydka-Zarzycka i wsp.*, 2013; *Mruk i Cheng*, 2015; *Wenda-Różewicka i Piasecka*, 2013; *Wenda-Różewicka i Wiszniewska*, 2013). Wraz z wiekiem mężczyzny może zmniejszać się liczba komórek Leydiga (*Gunes i wsp.*, 2016; *Kühnert i Nieschlag*, 2004; *Mahmoud i wsp.*, 2003; *Ramasamy i wsp.*, 2015; *Sharma i wsp.*, 2015; *Wenda-Różewicka i Wiszniewska*, 2013) pełniących funkcję endokrynną oraz neuroendokrynną. Komórki te regulują funkcję jąder poprzez produkcję m.in.: testosteronu, androstendionu, dehydroepiandrosteronu (DHEA, ang. *dehydroepiandrosterone*), relaksyny, transformującego czynnika wzrostu α (TGF- α , ang. *transforming growth factor α*) oraz β (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*), endorfin i oksytocyny (*Bilińska i wsp.*, 2013; *Kotula-Balak i wsp.*, 2013; *Martin*, 2016; *Wenda-Różewicka i Wiszniewska*, 2013). Wraz z wiekiem obniża się także liczba komórek Sertoliego (*Gunes i wsp.*, 2016; *Kühnert i Nieschlag*, 2004; *Mahmoud i wsp.*, 2003; *Ramasamy i wsp.*, 2015; *Sharma i wsp.*, 2015), które m.in. poprzez wytwarzanie specyficznych (unikatowych), kompleksowych połączeń międzykomórkowych¹, biorą udział w tworzeniu bariery krew–jądro, odżywiają i podtrzymują komórki spermatogenezy, fagocytują ciała resztkowe, produkują płyn kanalikowy, czynniki pobudzające i hamujące spermatogenezę, niewielkie ilości estrogenów, czynniki wzrostu i różnicowania oraz defensyny (*Bilińska i wsp.*, 2013; *Hejmej i wsp.*, 2013; *Iliadou i wsp.*, 2015; *Kopera-Sobota i wsp.*, 2013; *Łydka-Zarzycka i wsp.*, 2013; *Stanton*, 2016; *Wenda-Różewicka i Wiszniewska*, 2013). Zmniejsza się również liczba komórek germinalnych. Może dochodzić do pogrubienia blaszki właściwej (łac. *lamina propria*) kanalików nasiennych, osłabia się unaczynienie jąder, komórki stają się słabiej odżywione, ponieważ substancje transportowane wraz z krwią trudniej przez nią przenikają. Dlatego też może pojawiać się regresja nabłonka plemnikotwórczego (*Mahmoud i wsp.*, 2003; *Ramasamy i wsp.*, 2015; *Sharma i wsp.*, 2015; *Wenda-Różewicka i Wiszniewska*, 2013). W konsekwencji obok zaburzeń endokrynnych mogą powstawać lokalne zaburzenia interakcji międzykomórkowych i struktur pozakomórkowych (parakryne), które w warunkach prawidłowych niezbędne są do funkcjonowania nabłonka plemnikotwórczego. Niewątpliwie

1 Kompleksowe połączenia między komórkami Sertoliego wchodzące w skład najważniejszego elementu bariery krew–jądro budują: połączenia ścisłe (ang. *tight junctions*), bazalne specjalizacje powierzchniowe (ang. *basal ectoplasmic specializations*) i połączenia desmosomopodobne (ang. *desmosome-like junctions*) (*Łydka-Zarzycka i wsp.*, 2013; *Stanton*, 2016).

opisywane zaburzenia prowadzą do nieprawidłowości spermatogenezy i w konsekwencji do obniżenia standardowych i molekularnych parametrów seminologicznych. Patomechanizm wywołujący zaburzenia spermatogenezy pojawiające się wraz z wiekiem może być związany ze stresem oksydacyjnym i zaburzeniem równowagi pro i antyoksydacyjnej, co doprowadza do wzrostu reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*), które uszkadzają nabłonek plemnikotwórczy (Johnson i wsp., 2015) (rycina 1).

Standardowe parametry seminologiczne

Rutynowa analiza seminologiczna to pierwsze badanie oceniające potencjał płodności mężczyzny (WHO, 2010). Wraz z upływającym czasem może dochodzić do obniżenia podstawowych parametrów nasienia, jednakże wyniki prac autorów nie są jednoznaczne. Większość z nich wykazuje, iż z wiekiem mężczyzny zmniejsza się objętość ejakulatu, odsetek plemników wykazujących ruch postępowy czy też prawidłową budowę



Ryc. 1. Patomechanizm zmian w organizmie starzejących się mężczyzn w odniesieniu do gonady

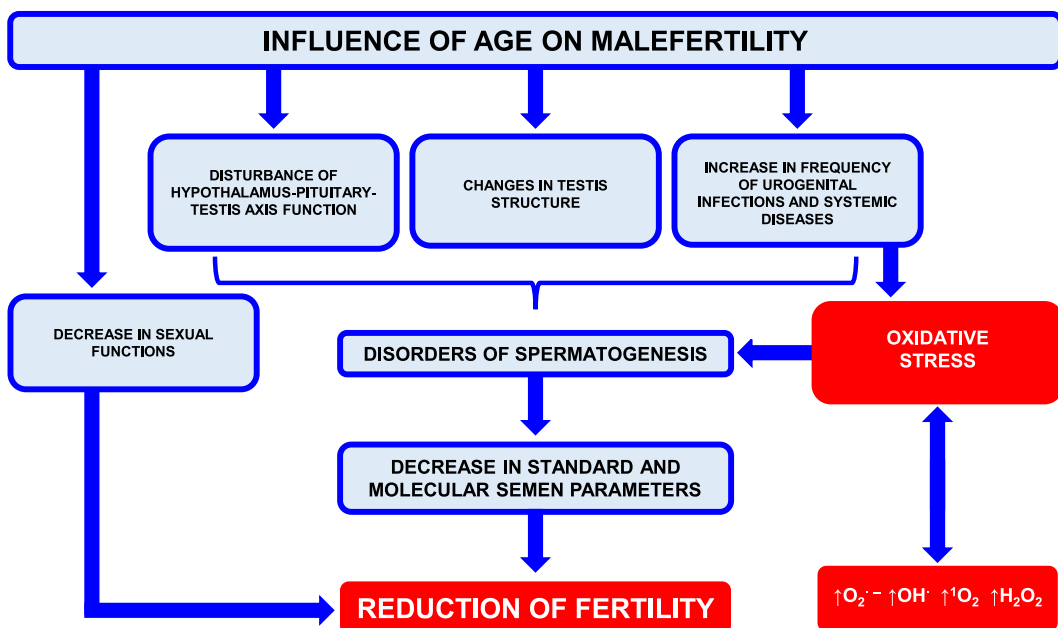


Fig. 1. Pathomechanism of changes in the aging men in respect to gonad

morfologiczną (Dain i wsp., 2011; Eisenberg i Meldrum, 2017; Gunes i wsp., 2016; Huang i wsp., 2017; Kokkinaki i wsp., 2010; Kovac i wsp., 2013; Li i wsp., 2016; Ramasamy i wsp., 2015; Sharma i wsp., 2015; Stone i wsp., 2013). Obniżyć może się również żywotność plemników oraz ich całkowita liczba w ejakulacie, przy czym nie obserwuje się znaczącego obniżenia koncentracji plemników, co może być maskowane poprzez spadek objętości ejakulatu (Belloc i wsp., 2014b; Conti i Eisengerg, 2016; Dain i wsp., 2011; Eisenberg i Meldrum, 2017; Johnson i wsp., 2015; Molina i wsp., 2010; Plastira i wsp., 2007; Zitzmann, 2013).

Objętość ejakulatu

Objętość ejakulatu jest parametrem, którego spadek wraz z wiekiem obserwowany jest najczęściej, szczególnie po 50. r.ż. mężczyzny (Jenkins i wsp., 2014; Kidd i wsp., 2001; Molina i wsp., 2010; Ng i wsp., 2004; Park i wsp. 2014; Stone i wsp. 2013; Whitcomb i wsp., 2011). Stone i wsp. (2013) wykazali, że objętość ejakulatu była mniejsza u mężczyzn po 45. r.ż. Z kolei Ng i wsp. (2004) stwierdzili spadek objętości ejakulatu u mężczyzn między 52. a 79. r.ż. w porównaniu z mężczyznami między 17. a 51. r.ż. Badając wpływ wieku mężczyzn na rezultaty procedur wspomaganego rozrodu, Whitcomb i wsp. (2011) ujawnili spadek objętości ejakulatu wraz z wiekiem (<30. r.ż., 30.–34. r.ż., 35.–39. r.ż., 40.–44. r.ż., 45.–49. r.ż., 50.–54. r.ż., ≥55. r.ż.). Badania przeprowadzone przez Molina i wsp. (2010) na grupie 9168 badanych w Kordobie pokazały, że objętość ejakulatu obniżała się istotnie u mężczyzn >50. r.ż. Podobnie Jenkins i wsp. (2014) wykazali istotny spadek objętości ejakulatu między porównywanymi grupami mężczyzn (mediana dla wieku: 37,7 vs. 50,3 r.ż.). W metaanalizie Kidd i wsp. (2001) również stwierdzili istotne obniżenie objętości ejakulatu u mężczyzn ≥50. r.ż. vs. <30. r.ż. Park i wsp. (2014), sprawdzając, czy wraz z wiekiem mężczyzny zwiększa się liczba wakuoli w główkach plemników, ustalili, iż u mężczyzn między 41. a 45. r.ż. istotnie zmniejszała się objętość ejakulatu, w porównaniu do mężczyzn z grup 26.–30. r.ż., 31.–35. r.ż., 36.–40. r.ż. oraz 46.–50. r.ż. Natomiast inni autorzy (Alshahrani i wsp., 2014; Brahem i wsp., 2011; García-Ferreya i wsp., 2015; Nijs i wsp., 2011; Rybar i wsp., 2011; Schmid i wsp., 2013; Slotter i wsp., 2006) nie wykazali spadku objętości ejakulatu w zależności od wieku badanego.

Trudno ustalić patomechanizm odpowiedzialny za zmniejszenie objętości ejakulatu wraz z wiekiem mężczyzny. Belloc i wsp. (2014b) oraz Zitzmann (2013) w opublikowanych pracach poglądowych wskazują, że do tej zmiany dochodzi ze względu na: 1) niewydolność naczyniową związaną z wiekiem, 2) choroby współistniejące (np. cukrzyca, nadciśnienie tętnicze), 3) przewlekłe zakażenia (np. zapalenia gruczołu krokowego), 4) otyłość, 5) niewydolność hormonalną i 6) dysfunkcję dodatkowych gruczołów płciowych.

Koncentracja plemników i ich całkowita liczba w ejakulacie

Cardona Maya i wsp. (2009) zaobserwowali istotną różnicę w koncentracji plemników tylko między mężczyznami ≤30. r.ż. vs. ≥40. r.ż. Z kolei różnicę w całkowitej liczbie plemników w ejakulacie ci sami autorzy wykazali w przypadku wszystkich porównywanych grup (≤30. r.ż. vs. 31.–40. r.ż.; ≤30. r.ż. vs. ≥40. r.ż.; 31.–40. r.ż. vs. ≥40. r.ż.). Podobnie Ng i wsp. (2004) wykazali spadek całkowitej liczby plemników w ejakulacie wraz z wiekiem (17.–51. vs. 52.–79. r.ż.). Obniżenie koncentracji męskich komórek rozrodczych zaobserwowali również Stone i wsp. (2013), w ich badaniach parametr ten zmniejszał się istotnie po 40. r.ż. mężczyzny. Badacze wyznaczyli 34. r.ż. mężczyzny jako wiek krytyczny dla tego parametru. Z kolei Molina i wsp. (2010), Park i wsp. (2014), Ng i wsp. (2004) nie zaobserwowali różnic w koncentracji plemników między mężczyznami z porównywanych grup.

Morfologia plemników

Badania przeprowadzone przez Molina i wsp. (2010) wskazują, że odsetek plemników morfologicznie prawidłowych obniżał się istotnie u mężczyzn >50. r.ż., porównywalne wyniki uzyskali García-Ferreya i wsp. (2015). Istotny spadek komórek o prawidłowej morfologii oraz podwyższenie indeksu teratozoospermii (TZI, ang. *teratozoospermia index*)² między badanymi grupami wiekowymi mężczyzn (19.–51. vs. 52.–79. r.ż.) wykazali również Ng i wsp. (2004). Stone i wsp. (2013) stwierdzili, że prawidłowa morfologia plemników obniżała się istotnie po 40. r.ż. mężczyzny. Natomiast Park i wsp. (2014) u mężczyzn nie wykazali istotnych różnic w przypadku tego parametru.

Ruchliwość plemników

Spadek ruchliwości plemników po 35. r.ż. wykazali Molina i wsp. (2010), a po 43. r.ż. Stone i wsp. (2013). Podobnie Cocuzza i wsp. (2008) oraz Cardona Maya i wsp. (2009) ujawnili spadek ruchliwości plemników w grupie mężczyzn ≥40. r.ż. w porównaniu z badanymi <40. r.ż. lub ≤30. r.ż. Również Schmid i wsp. (2013), Whitcomb i wsp. (2011) oraz Slotter i wsp. (2006) zaobserwowali obniżenie ruchliwości u mężczyzn wraz z wiekiem. Z kolei inni nie wykazali istotnych różnic w przypadku tego parametru (Park i wsp., 2014; García-Ferreya i wsp., 2015; Ng i wsp., 2004).

Żywotność plemników

Park i wsp. (2014) stwierdzili, iż u mężczyzn między 41. a 45. r.ż. istotnie zmniejszał się odsetek plemników żywych, w porównaniu z pozostałymi grupami badanych

² Indeks teratozoospermii – TZI, określa zakres wielokrotnych defektów plemnika i informuje o średniej liczbie nieprawidłowości morfologicznych przypadających na jeden plemnik (Piasecka i wsp., 2013).

(26.–30. r.ż., 31.–35. r.ż., 36.–40. r.ż. oraz 46.–50. r.ż.). *Molina i wsp.* (2010) wykazali, że żywotność plemników zmniejszała się istotnie już po ukończonym 35. r.ż. Na spadek odsetka plemników żywych wraz z wiekiem wskazują także badania *Stone i wsp.* (2013) oraz *Ng i wsp.* (2004). Natomiast *García-Ferreyra i wsp.* (2015) oraz *Whitcomb i wsp.* (2011) nie wykazali istotnych różnic między porównywanymi grupami mężczyzn w przypadku odsetka plemników żywych.

Zmiany w plazmie nasienia

Wraz z wiekiem dochodzi również do zmian stężenia pierwiastków śladowych w plemniku i plazmie nasiennej. Możemy zaobserwować wzrost stężenia miedzi, wapnia i cynku w męskich komórkach rozrodczych oraz siarki w plazmie nasienia. Obniża się również w plazmie nasienia stężenie fruktozy i aktywność α -glukozydazy, ze względu na dysfunkcje pęcherzyków nasiennych, prostaty oraz jądra (Molina i wsp., 2010; Schmid i wsp., 2013).

Molekularne zmiany chromatyny plemnika

Analiza dojrzałości chromatyny plemników jest ważnym elementem oceny męskiej płodności i nie ulega wątpliwości, iż powinna być kolejnym krokiem po standardowym badaniu seminologicznym. Pozwala na weryfikację jakości materiału genetycznego plemników oraz ich przydatności do technik wspomaganego rozrodu.

Chromatyna plemnika wykazuje unikatową budowę. Zawiera 2–15% histonów jądrowych oraz specyficzne dla niej protaminy (protamina 1 i protamina 2), bogate w cysteinę i argininę. Pozwala to na wytworzenie stabilnego kompleksu z DNA, a dalej utworzenie struktury toroidu (ang. *protamine toroid*) (Oliva, 2006; Oliva i wsp., 2009; Ward, 2017). Budowa toroidu jest wysoce odmienna od struktury nukleosomowej materiału genetycznego dzięki obecności protamin, które są bardziej zasadowe niż białka histonowe charakterystyczne przede wszystkim dla komórek somatycznych. Toroid zbudowany jest ze ściśle upakowanych pętli (domeny 50 kbp – tysiąc par zasad, ang. *kilo base pairs*), stabilizowanych jonami cynku. Poszczególne toroidy powiązane są ze sobą za pomocą łącznikowych pętli DNA (ang. *toroid linker*) wykazujących budowę nukleosomową, które związane są z włóknami macierzy jądrowej (ang. *matrix attachment region*). Ściśle przyleganie do siebie bocznymi powierzchniami toroidów prowadzi do utworzenia prawidłowej struktury materiału genetycznego gamety męskiej (Carrell i wsp., 2007; Francis i wsp., 2014; Kazienko i wsp., 2012; Lewis i wsp., 2004; Martin-Coello i wsp., 2011; Oliva, 2006; Oliva i Castillo, 2011; Piasecka i wsp., 2013; Rathke i wsp., 2014; Venkatesh i wsp., 2011; Ward, 2010, 2011, 2017).

W trakcie przebudowy chromatyny plemników może dochodzić do wielu nieprawidłowości, szczególnie u starszych mężczyzn. Zaburzenia te mogą pojawiać się na różnych etapach i w konsekwencji prowadzić

do nieprawidłowej kondensacji chromatyny plemników. Przyczyna może być związana z: 1) nadmiarem resztkowych histonów jądrowych, gdy proces ich zastępowania przez białka przejściowe jest upośledzony, 2) zaburzonym procesem protaminacji, gdy białka przejściowe nie są w prawidłowy sposób zastępowane protaminami, co może zmieniać stosunek protaminy 1 do protaminy 2 i destabilizować strukturę chromatyny gamet męskich, 3) obecnością przetrwałych nacięć DNA, które w warunkach fizjologicznych pojawiają się podczas przebudowy chromatyny (Belloc i wsp., 2014b; Bungum i wsp., 2011; Das i wsp., 2013; Jenkins i wsp., 2014; Leach i wsp., 2015; Ramasamy i wsp., 2015; Sharma i wsp., 2015). Dlatego też tak ważne jest wykorzystanie różnych technik badawczych weryfikujących nieprawidłowości chromatyny na różnych etapach jej przebudowy (Agarwal i wsp., 2016, 2017; van der Horst i du Plessis, 2017; Ward, 2017). Pozwoli to ocenić, który z tych etapów jest szczególnie podatny na działanie czasu.

Należy podkreślić, że fragmentacja DNA plemników, która zdecydowanie zwiększa się wraz z wiekiem (Alshahrani i wsp., 2014; Belloc i wsp., 2014a; Das i wsp., 2013; García-Ferreyra i wsp., 2015; Johnson i wsp., 2015; Katib i wsp., 2014; Plastira i wsp., 2007; Pourmasumi i wsp., 2017; Sartorius i Nieschlag, 2010; Schmid i wsp., 2013; Sharma i wsp., 2004, 2015; Vagnini i wsp., 2007), związana jest również ze stresem oksydacyjnym i generowaniem nadmiaru RFT, których źródłem obok niedojrzałych form plemników powstałych w skutek zaburzeń spermatogenezy i nieudanej apoptozy wysoce zróżnicowanych komórek germinalnych (Agarwal i wsp., 2016; Aitken 2013, 2017; Aitken i De Iulii, 2007; Sakkas i Alvarez, 2010) są stany zapalne oraz infekcje, szczególnie w obrębie układu moczowo-płciowego (Avellino i wsp., 2017; Belloc i wsp., 2014a; Bisht i Dada, 2017; Dorostghoal i wsp., 2017; Gunes i wsp., 2016; Katib i wsp., 2014; Sabeti i wsp., 2016). Zmianom tym towarzyszy zmniejszenie rezerwy antyoksydacyjnej (Frączek i Kurpisz, 2005; Walczak-Jędrzejowska, 2015). Wykazano pozytywną korelację wieku mężczyzny z poziomem reaktywnych form tlenu w nasieniu ($r = 0,2$) (Cocuzza i wsp., 2008).

Alshahrani i wsp. (2014) prowadzili badania dotyczące wpływu wieku mężczyzny na standardowe parametry seminologiczne, obecność reaktywnych form tlenu oraz fragmentację DNA (metodą TUNEL, ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*). Wykazali, że plemniki mężczyzn >40 . r.ż. miały wyższą fragmentację materiału genetycznego (średnia: $24,4 \pm 18,5\%$) w porównaniu mężczyznami ≤ 30 . r.ż., 31.–40. r.ż. i <40 . r.ż. (średnia odpowiednio: $16,7 \pm 11,2\%$; $19,1 \pm 14,6\%$; $18,7 \pm 14,1\%$)³. Podobnie Vagnini i wsp. (2007) istotne różnice w odsetku plemników

3 Uważa się, że niski stopień uszkodzenia chromatyny ma miejsce wtedy, gdy odsetek plemników z niedojrzałą chromatyną mieści się w zakresie 0–15%, średni, gdy jest >15 –30%, z kolei wysoki, gdy wynosi $>30\%$ (Agarwal i wsp., 2017; Bungum i wsp., 2011; Evenson, 2017; Leach i wsp., 2015; Moskovtsev i wsp., 2006; Simon i wsp., 2017).

z pofragmentowanym materiałem genetycznym zaobserwowali między badanymi ≤ 35 . r.ż. vs. 36.–39. r.ż. oraz ≤ 35 . r.ż. vs. ≥ 40 . r.ż. Z kolei *Plastira i wsp. (2007)* porównali materiał genetyczny plemników pozyskany od mężczyzn z oligoastenoteratozoospermia (OAT, ang. *oligoasthenoteratozoospermia*) oraz mężczyzn z normozoospermia w dwóch grupach wiekowych: 24.–34. r.ż. i 35.–45. r.ż. Badacze wykazali istotnie wyższy odsetek komórek TUNEL-pozytywnych, a także CMA3-pozytywnych z obniżoną protaminacją, barwionych fluorochromem chromomycyną A3 (CMA3, ang. *chromomycin A3*), w grupie mężczyzn starszych z OAT w porównaniu z młodszymi (odpowiednio średnia: 33,7 \pm 6,7% vs. 26,3 \pm 5,3%; 35,4 \pm 8,2% vs. 27,5 \pm 7,9%) oraz istotne korelacje wieku z odsetkiem plemników z uszkodzoną chromatyną. Natomiast ci sami autorzy nie wykazali tych różnic ani korelacji u mężczyzn z normozoospermia. Również *Winkle i wsp. (2009)* istotne różnice w integralności materiału genetycznego w zależności od wieku badanych zanotowali tylko w przypadku mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami seminologicznymi. Odsetek plemników z uszkodzonym DNA był wyższy w grupie mężczyzn ≥ 40 . r.ż. w porównaniu z badanymi mającymi 36.–39. r.ż. (średnia: 25,00 \pm 21,04 vs. 18,58 \pm 15,00%). Z kolei inni badacze wykorzystując test z oranżem akrydyny (AO, ang. *acridine orange*), weryfikujący komórki z pojedynczą i podwójną nicią DNA, stwierdzili także związek między uszkodzeniem DNA plemników a wiekiem mężczyzn (*Das i wsp., 2013; Moskovtsev i wsp., 2006; Schmid i wsp., 2013*). *Das i wsp. (2013)* wykazali istotnie wyższy odsetek komórek z nieprawidłowym materiałem genetycznym u mężczyzn ≥ 40 . r.ż. w porównaniu z mężczyznami < 40 . r.ż. zarówno w grupie z normozoospermia (średnia: 17,0 \pm 13,0 vs. 12,0 \pm 8,0%), jak i nieprawidłowymi parametrami nasienia (średnia: 20,0 \pm 18,0 vs. 12,0 \pm 10,0%). *Moskovtsev i wsp. (2006)* wykazali istotne różnice w odsetku plemników z pojedynczą nicią DNA między mężczyznami z grup < 30 . r.ż., 30.–34. r.ż., 35.–39. r.ż. i 40.–44. r.ż. (średnia odpowiednio: 15,2 \pm 8,4%; 19,4 \pm 12,1%; 20,1 \pm 10,9%; 26,4 \pm 16,0%) a mężczyznami ≥ 45 . r.ż. (średnia: 32,0 \pm 17,1%). *Schmid i wsp. (2013)* porównując mężczyzn między 22.–28. r.ż. z mężczyznami między 65.–80. r.ż., znaleźli istotne różnice w odsetku plemników z pofragmentowanym materiałem genetycznym (mediana: 2,4 vs. 4,1%), wykorzystując test SCSA (ang. *sperm chromatin structure assay*). Wpływ wieku na fragmentację DNA plemników ujawnili również *García-Ferreira i wsp. (2015)*, wykorzystując test dyspersji chromatyny plemników. Autorzy stwierdzili istotnie wyższy odsetek plemników z pofragmentowanym DNA u mężczyzn ≥ 50 . r.ż. (średnia: 37,1 \pm 17,61%) w porównaniu z mężczyznami ≤ 39 . r.ż. oraz 40.–49. r.ż. (średnia odpowiednio: 17,4 \pm 10,79%; 21,3 \pm 13,48%).

Nie zawsze jednak związek między integralnością chromatyny a wiekiem badanego jest stwierdzany. *Brahem i wsp. (2011)* badając płodnych i niepłodnych mężczyzn, nie znaleźli asocjacji między fragmentacją DNA a wiekiem w porównywanych grupach wiekowych

mężczyzn (20.–29. r.ż., 30.–39. r.ż., 40.–49. r.ż., 50.–70. r.ż.). *Kim i wsp. (2013)* wykorzystując test z błękitem aniliny (AB, ang. *aniline blue*), ujawniający plemniki z nadmiarem resztkowych histonów oraz test z błękitem toluidyny (TB, ang. *toluidine blue*), weryfikujący zaburzenia struktury chromatyny plemników, nie wykazali istotnych różnic pomiędzy porównywanymi grupami wiekowymi (≤ 34 ., 35.–39., ≥ 40 .). Podobne wyniki uzyskali *Rybar i wsp. (2011)*, którzy oprócz testów z AB i TB wykorzystali CMA3. Badanych podzielili na 3 grupy: 20.–30. r.ż., 31.–40. r.ż., 41.–61. r.ż., lecz między żadną z nich nie stwierdzili istotnych różnic. Natomiast *Virant-Klun i wsp. (2002)* ocenili wpływ odsetka plemników z pojedynczą nicią DNA na jakość zarodka po zastosowaniu docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI, ang. *intracytoplasmic sperm injection*). Badacze dzieląc mężczyzn na grupy, ze względu na odsetek plemników z nieprawidłowym materiałem genetycznym (0–55%, 56–100%), nie wykazali istotnych różnic w przypadku ich wieku. Analogiczne rezultaty badań dotyczące obecności w nasieniu plemników z pojedynczą nicią DNA przedstawili *Nijs i wsp. (2011)*. Autorzy badając mężczyzn ≤ 34 . r.ż., 35.–40. r.ż. i > 40 . r.ż. nie stwierdzili znaczących różnic między porównywanymi grupami. Z kolei *Kazerooni i wsp. (2009)* wykorzystując test z AO, nie stwierdzili istotnych korelacji między wiekiem mężczyzn a wynikami zastosowanego testu.

Z wiekiem dochodzi również do intensyfikacji procesów metylacji materiału genetycznego plemników. Wykazano pozytywną korelację ($r = 0,475$) wieku ze stężeniem 5-metylocytozyny (5mC, ang. *5-methylcytosine*) w męskich komórkach rozrodczych (*Jenkins i wsp., 2013, 2014*). Wraz z wiekiem mężczyzny wzrasta również liczba plemników z dużymi jądrowymi wakuolami (LNV, ang. *large nuclear vacuoles*) (*de Almeida Ferreira Braga i wsp., 2011; Perdrix i Rives, 2013*). Dowiedziono, iż u mężczyzn w grupach wiekowych 36.–40. r.ż. i > 40 . r.ż. zwiększa się odsetek komórek z LNV w porównaniu do mężczyzn < 35 . r.ż. (*Silva i wsp., 2012*).

Nie ulega wątpliwości fakt, że zdolność plemników do zapłodnienia wyraźnie zmniejsza się wraz z wiekiem mężczyzny, zarówno w warunkach naturalnej prokreacji, jak i wspomaganiej medycznie. Zaburzenia te mogą prowadzić do problemów z uzyskaniem ciąży, jej donoszeniem, a także rozwojem zarodka (*Johnson i wsp., 2015; Ramasamy i wsp., 2015; Zitzmann, 2013*).

■ Piśmiennictwo

Agarwal A., Chak-Lam C., Majzoub A., Esteves S.: The society for translational medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Transl Androl Urol.* 2017, 6, 720–733. doi: 10.21037/tau.2017.08.06. PMID: 29082206.

Agarwal A., Majzoub A., Esteves S.C., Ko E., Ramasamy R., Zini A.: Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol.* 2016, 5, 935–950. doi: 10.21037/tau.2016.10.03. PMID: 28078226.

- Aitken R.J.: DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. *Transl Androl Urol*. 2017, S761–S764. doi: 10.21037/tau.2017.09.13. PMID: 29082208.
- Aitken R.J.: Human spermatozoa: revelations on the road to conception. *F1000Prime Rep*. 2013, 1, 5–39. doi: 10.12703/P5-39. PMID: 24167720.
- Aitken R.J., De Iulius G.N.: Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online*. 2007, 14, 727–33. PMID: 17579989.
- Alshahrani S., Agarwal A., Assidi M., Abuzenadah A.M., Durairajanayagam D., Ayaz A. *i wsp.*: Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014, 20, 12, 103. doi: 10.1186/1477-7827-12-103. PMID: 25410314.
- Avellino G., Theva D., Oates R.D.: Common urologic diseases in older men and their treatment: how they impact fertility. *Fertil Steril*. 2017, 107, 305–311. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.008. PMID: 28073432.
- Belloc S., Benkhalifa M., Cohen-Bacrie M., Dalleac A., Amar E., Zini A.: Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertil Steril*. 2014a, 101, 1588–1593. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.006. PMID: 24690240.
- Belloc S., Hazout A., Zini A., Merviel P., Cabry R., Chahine H., Copin H. *i wsp.*: How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility. *Maturitas*. 2014b, 78, 22–29. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.02.011. PMID: 24680129.
- Bilińska B., Hejmej A., Kopera-Sobota I., Kotula-Balak M., Łydka-Zarzycka M., Chojnacka K.: Regulacja spermatogenezy. W: Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne. Red. M. Piasecka. Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, 247–264.
- Bisht S., Dada R.: Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017, 1, 420–447. PMID: 28410127.
- Brahem S., Mehdi M., Elghezal H., Saad A.: The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet*. 2011, 28, 425–432. doi: 10.1007/s10815-011-9537-5. PMID: 21287403.
- 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. doi: 10.1038/aja.2010.73. PMID: 21057512.
- Cabral R.D., Busin L., Rosito T.E., Koff W.J.: Performance of Massachusetts Male Aging Study (MMAS) and androgen deficiency in the aging male (ADAM) questionnaires in the prediction of free testosterone in patients aged 40 years or older treated in outpatient regimen. *Aging Male*. 2014, 17, 147–154. doi: 10.3109/13685538.2014.908460. PMID: 24739016.
- Cardona Maya W., Berdugo J., Cadavid Jaramillo A.: The effects of male age on semen parameters: analysis of 1364 men attending an andrology center. *Aging Male*. 2009, 12, 100–103. doi: 10.3109/13685530903322841. PMID: 19883297.
- Carrell D.T., Emery B.R., Hammoud S.: Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*. 2007, 13, 313–327. doi: 10.1093/humupd/dml057. PMID: 17208950.
- Cocuzza M., Athayde K.S., Agarwal A., Sharma R., Pagani R., Lucon A.M. *i wsp.*: Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology*. 2008, 71, 490–494. doi: 10.1016/j.urology.2007.11.041. PMID: 18342194.
- Conti S.L., Eisenberg M.L.: Paternal aging and increased risk of congenital disease, psychiatric disorders, and cancer. *Asian J Androl*. 2016, 18 (3), 420–424. doi: 10.4103/1008-682X.175097. PMID: 26975491.
- Dain L., Auslander R., Dirnfeld M.: The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. *Fertil Steril*. 2011, 95 (1), 1–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.029. PMID: 20932518.
- Das M., Al-Hathal N., San-Gabriel M., Phillips S., Kadoch I., Bissonnette F. *i wsp.*: High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *J Assist Reprod Genet*. 2013, 30, 843–848. doi: 10.1007/s10815-013-0015-0. PMID: 23722935.
- de Almeida Ferreira Braga D.P., Setti A.S., Figueira R.C., Nichi M., Martinhago C.D., Iaconelli A. Jr. *i wsp.*: Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology*. 2011, 78, 786–791. doi: 10.1016/j.urology.2011.06.018. PMID: 21820702.
- Dorostghoal M., Kazeminejad S.R., Shahbazian N., Pourmehdi M., Jabbari A.: Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 2017. doi: 10.1111/and.12762. PMID: 28124476.
- Dubov T., Toledano-Alhadeff H., Bokstein F., Constantini S., Ben-Shachar S.: The effect of parental age on the presence of de novo mutations – Lessons from neurofibromatosis type I. *Mol Genet Genomic Med*. 2016, 4, 480–486. doi: 10.1002/mgg3.222. PMID: 27468422.
- Eisenberg M.L., Meldrum D.: Effects of age on fertility and sexual function. *Fertil Steril*. 2017, 107 (2), 301–304. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.018. PMID: 28160919.
- Evenson D.P.: 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. doi: 10.21037/tau.2017.07.20. PMID: 29082168.
- 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. PMID: 24869677. doi: 10.3109/14647273.2014.915347.
- Frączek M., Kurpisz M.: System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. *Postepy Hig Med Dosw. [online]*. 2005, 59, 523–534.
- García-Ferreira J., Luna D., Villegas L., Romero R., Zavala P., Hilario R. *i wsp.*: High Aneuploidy Rates Observed in Embryos Derived from Donated Oocytes are Related to Male Aging and High Percentages of Sperm DNA Fragmentation. *Clin Med Insights Reprod Health*. 2015, 11, 9, 21–27. doi: 10.4137/CMRH.S32769. PMID: 26604851.
- Główny Urząd Statystyczny. Rocznik Demograficzny. Red. D. Rozkrut. Wyd. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa 2017.
- Gomuła A., Rabijewski M.: Zespół niedoboru testosteronu – rozpoznawanie i leczenie na podstawie norm stężenia testosteronu należnych dla wieku. *Seksuol Pol*. 2010, 8, 1–16.
- Gray A., Feldman H.A., McKinlay J.B., Longcope C.: Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991, 73, 1016–1025. doi: 10.1210/jcem-73-5-1016. PMID: 1719016.
- Gunes S., Hekim G.N., Arslan M.A., Asci R.: Effects of aging on the male reproductive system. *J Assist Reprod Genet*. 2016, 33, 441–454. doi: 10.1007/s10815-016-0663-y. PMID: 26867640.
- Harris B.S., Bishop K.C., Kemeny H.R., Walker J.S., Rhee E., Kuller J.A.: Risk Factors for Birth Defects. *Obstet Gynecol Surv*, 2017, 72 (2), 123–135. doi: 10.1097/OGX.0000000000000405. PMID: 28218773.
- Hejmej A., Kotula-Balak M., Górowska E., Bilińska B.: Regulacja steroidogenezy. W: Badania nad rolą estrogenów w gonadzie męskiej. Red. M. Piasecka. Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, 282–300.
- Herati A.S., Zhelyazkova B.H., Butler P.R., Lamb D.J.: Age-related alterations in the genetics and genomics of the male germ line. *Fertil Steril*. 2017, 107, 319–323. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.021. PMID: 28160920.
- Huang C., Li B., Xu K., Liu D., Hu J., Yang Y. *i wsp.*: Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015. *Fertil Steril*. 2017, 107, 83–88. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.035. PMID: 27793371.
- Iliadou P.K., Tsametis C., Kaprara A., Papadimas I., Goulis D.G.: The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones (Athens)*. 2015, 14, 504–514. doi: 10.14310/horm.2002.1648. PMID: 26859601.
- Jenkins T.G., Aston K.I., Cairns B.R., Carrell D.T.: Paternal aging and associated intraindividual alterations of global sperm 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine levels. *Fertil Steril*. 2013, 100, 945–51. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.039. PMID: 23809503.
- Jenkins T.G., Aston K.I., Pflueger C., Cairns B.R., Carrell D.T.: Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet*. 2014, 10, 10. doi: 10.1371/journal.pgen.1004458. PMID: 25010591.
- Jennings M.O., Owen R.C., Keefe D., Kim E.D.: Management and counseling of the male with advanced paternal age. *Fertil Steril*. 2017, 107, 324–328. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.11.018. PMID: 28069174.

- Giann B.P.: Challenges in the diagnosis and treatment of testosterone deficiency in men. *Transl Androl Urol*. 2017, 6 (3):AB017. doi: 10.21037/tau.2017.s017.
- Johnson S.L., Dunleavy J., Gemmill N.J., Nakagawa S.: Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2015, 19, 22–33. doi: 10.1016/j.arr.2014.10.007. PMID: 25462195.
- Katib A.A., Al-Hawsawi K., Motair W., Bawa A.M.: Secondary infertility and the aging male, overview. *Cent European J Urol*. 2014, 67, 184–188. doi: 10.5173/ceju.2014.02.art13. PMID: 25140235.
- Kazerooni T., Asadi N., Jadid L., Kazerooni M., Ghanadi A., Ghaffarpasand F. i wsp.: Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet*. 2009, 26, 591–596. doi: 10.1007/s10815-009-9361-3. PMID: 19894107.
- Kazienko A., Piasecka M., Rymaszewska A., Gaczarzewicz D., Kurzawa R., Fraczek M. i wsp.: Molekularne markery niepłodności męskiej: zmiany polimorficzne genów białek chromatyny plemnika – część I. *Post Biol Komórki*. 2012, 39, 345–370.
- Kidd S.A., Eskenazi B., Wyrobek A.J.: Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril*. 2001, 75, 237–248. PMID: 11172821.
- Kim H.S., Kang M.J., Kim S.A., Oh S.K., Kim H., Ku S.Y. i wsp.: The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med*, 2013, 40, 23–28. doi: 10.5653/cerm.2013.40.1.23. PMID: 23614112.
- Kokkinaki M., Lee T.L., He Z., Jiang J., Golestaneh N., Hofmann M.C. i wsp.: Age affects gene expression in mouse spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction*. 2010, 139, 1011–1020. doi: 10.1530/REP-09-0566. PMID: 20371641.
- Kopera-Sobota I., Łydko-Zarzycka M., Chojnacka K., Sadowska M.J., Bilińska B.: Połączenia między komórkami nabłonka plemnikotwórczego. W: Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne. Red. M. Piasecka. Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, 214–222.
- Kotula-Balak M., Chojnacka K., Górowska E., Bilińska B.: Regulacja steroidogenez. W: Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne. Red. M. Piasecka. Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, 265–281.
- Kovac J.R., Addai J., Smith R.P., Coward R.M., Lamb D.J., Lipshultz L.I.: The effects of advanced paternal age on fertility. *Asian J Androl*. 2013, 15, 723–728. doi: 10.1038/aja.2013.92. PMID: 23912310.
- Kühnert B., Nieschlag E.: Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod*. 2004, 10, 327–339. doi: 10.1093/humupd/dmh030. PMID: 15192059.
- Kula K., Słowikowska-Hilczner J.: Hipogonadyzm późny u mężczyzn. *Endokrynol. Pol*, 2012, 63, 15–19.
- Kula K., Walczak-Jędrzejowska R., Kula P., Marchlewska K., Oszukowska E., Słowikowska-Hilczner J.: Postępy badań nad hipogonadyzmem u starszych mężczyzn. *Postępy Androl Online*. 2015, 2 (2), 5–11. [przeglądany: 12.11.2017 r.]. Dostępny w: <http://www.postepyandrologii.pl>
- Leach M., Aitken R.J., Sacks G.: Sperm DNA fragmentation abnormalities in men from couples with a history of recurrent miscarriage. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2015, 55 (4), 379–383. doi: 10.1111/ajo.12373. PMID: 26201831.
- Lewis J.D., Saperas N., Song Y., Zamora M.J., Chiva M., Ausió J.: Histone H1 and the origin of protamines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101, 4148–4152. doi: 10.1073/pnas.0308721101. PMID: 15024099.
- Li C.J., Tzeng C.R., Chen R.Y., Han B.C., Yeh C.Y., Chien L.C.: Decline in semen quality in men in northern Taiwan between 2001 and 2010. *Chin J Physiol*. 2016, 31, 59, 355–365. doi: 10.4077/CJP.2016.BAF441. PMID: 27817197.
- Luthardt F., Keitge E.: Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. doi: 10.1038/npq.els.0001446
- Łydko-Zarzycka M., Kopera-Sobota I., Chojnacka K., Sadowska M.J., Bilińska B.: Bariery krew-jądro. W: Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne. Red. M. Piasecka. Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, 208–213.
- Mahmoud A.M., Goemaere S., El-Garem Y., Van Pottelbergh I., Comhaire F.H., Kaufman J.M.: Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88, 179–184. doi: 10.1210/jc.2002-020408. PMID: 12519849.
- Martin L.J.: Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. *Mol Reprod Dev*. 2016, 83, 470–487. doi: 10.1002/mrd.22648 PMID: 27079813.
- Martin-Coello J., Gomendio M., Roldan E.R.: Protamine 3 shows evidence of weak, positive selection in mouse species (genus *Mus*) – but it is not a protamine. *Biol Reprod*. 2011, 84, 320–326. doi: 10.1095/biolreprod.110.086454. PMID: 20944085.
- Molina R.I., Martini A.C., Tissera A., Olmedo J., Senestrari D., de Cuneo M.F. i wsp.: Semen quality and aging: analysis of 9.168 samples in Cordoba, Argentina. *Androl Arch Esp Urol*. 2010, 63, 214–221. PMID: 20431185.
- Morales A., Lunenfeld B.: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. *Aging Male*. 2002, 5, 74–86. PMID: 12198738.
- Moskovtsev S.I., Willis J., Mullen J.B.: Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril*. 2006, 85, 496–499. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.075. PMID: 16595239.
- Mruk D.D., Cheng C.Y.: The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*. 2015, 36, 564–91. doi: 10.1210/er.2014-1101. PMID: 26357922.
- Ng K.K., Donat R., Chan L., Lalak A., Di Pierro I., Handelsman D.J.: Sperm output of older men. *Hum Reprod*. 2004, 19, 1811–1815. doi: 10.1093/humrep/deh315. PMID: 15218002
- Nieschlag E., Swerdloff R., Behre H.M., Gooren L.J., Kaufman J.M., Legros J.J. i wsp.: Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in male: ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *J Androl*. 2006, 27, 135–137. doi: 10.2164/jandrol.05047. PMID: 16474020.
- Nijs M., De Jonge C., Cox A., Janssen M., Bosmans E., Ombelet W.: Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology. *Andrologia*. 2011, 43, 174–179. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01040.x. PMID: 21561463.
- Nybo-Andersen A.M., Urhoj S.K.: Is advanced paternal age a health risk for the offspring? *Fertil Steril*. 2017, 107, 312–318. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.019. PMID: 28088314.
- Oliva R.: Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006, 12, 417–435. doi: 10.1093/humupd/dml009. PMID: 16581810.
- Oliva R., Castillo J.: Proteomics and genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl*. 2011, 13, 24–30. doi: 10.1038/aja.2010.65. PMID: 21042303.
- Oliva R., de Mateo S., Estanyol M.: Sperm cell proteomics. *Proteomics*. 2009, 9, 1004–1017. doi: 10.1002/pmic.200800588. PMID: 19212950.
- Park Y.S., Park S., Ko D.S., Park D.W., Seo J.T., Yang K.M.: Observation of sperm-head vacuoles and sperm morphology under light microscope. *Clin Exp Reprod Med*. 2014, 41, 132–136. doi: 10.5653/cerm.2014.41.3.132. PMID: 25309858.
- Perdrix A., Rives N.: Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) and sperm head vacuoles: state of the art in 2013. *Hum Reprod Update*. 2013, 19, 527–541. doi: 10.1093/humupd/dmt021. PMID: 23825157.
- Piasecka M., Gill K., Gaczarzewicz D., Kazienko A., Rosiak A., Udała J. i wsp.: Znaczenie morfologicznej oceny plemników w diagnostyce seminologicznej. W: Układ płciowy męski. Piasecka M. (red.). Wyd. PUM w Szczecinie 2013, 97–123.
- Plastira K., Msaouel P., Angelopoulou R., Zanioti K., Plastiras A., Pothos A. i wsp.: The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet*. 2007, 24, 437–443. doi: 10.1007/s10815-007-9162-5. PMID: 17768675.
- Pourmasumi S., Sabeti P., Rahiminia T., Mangoli E., Tabibnejad N., Talebi A.: The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2017, 15, 331–344. PMID: 29177237.

- Priskorn L., Jensen T.K., Lindahl-Jacobsen R., Skakkebaek N.E., Bostofte E., Eisenberg M.L.: Parental age at delivery and a man's semen quality. *Hum Reprod*. 2014, 29, 1097–102. doi: 10.1093/humrep/deu039. PMID: 24578474.
- Ramasamy R., Chiba K., Butler P., Lamb D.J.: Male biological clock: a critical analysis of advanced paternal age. *Fertil Steril*. 2015, 103 (6), 1402–1406. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.011. PMID: 25881878.
- Rathke C., Baarends W.M., Awe S., Renkawitz-Pohl R.: Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1839, 155–168. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.08.004. PMID: 24091090.
- Rybar R., Kopecka V., Prinosilova P., Markova P., Rubes J.: Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia*. 2011, 43, 286–291. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01057.x. PMID: 21486403.
- Sabeti P., Pourmasumi S., Rahimnia T., Akyash F., Talebi A.R.: Etiologies of sperm oxidative stress. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2016, 14, 231–240. PMID: 27351024.
- Sakkas D., Alvarez J.G.: Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010, 1, 93, 1027–1036. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046. PMID: 20080235.
- Sartorius G.A., Nieschlag E.: Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2010, 16, 65–79. doi: 10.1093/humupd/dmp027. PMID: 19696093.
- Schmid T.E., Grant P.G., Marchetti F., Weldon R.H., Eskenazi B., Wyrobek A.J.: Elemental composition of human semen is associated with motility and genomic sperm defects among older men. *Hum Reprod*. 2013, 28, 274–282. doi: 10.1093/humrep/des321. PMID: 23042799.
- Sharma R.K., Agarwal A., Rohra V.K., Assidi M., Abu-Elmagd M., Turki R.F.: Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015, 19, 13–35. doi: 10.1186/s12958-015-0028-x. PMID: 25928123.
- Sharma R.K., Said T., Agarwal A.: Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*. 2004, 6, 139–148. PMID: 15154089.
- Sigman M.: Introduction: What to do with older prospective fathers: the risks of advanced paternal age. *Fertil Steril*. 2017, 107, 299–300. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.020. PMID: 28160918.
- Silva L.F., Oliveira J.B., Petersen C.G., Mauri A.L., Massaro F.C., Cavagna M. i wsp.: The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Reprod Biol Endocrinol*. 2012, 19, 10–19. doi: 10.1186/1477-7827-10-19. PMID: 22429861.
- Simon L., Zini A., Dyachenko A., Ciampi A., Carrell D.T.: A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*. 2017, 19 (1), 80–90. doi: 10.4103/1008-682X.182822. PMID: 27345006.
- Sloter E., Schmid T.E., Marchetti F., Eskenazi B., Nath J., Wyrobek A.J.: Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum Reprod*. 2006, 21 (11), 2868–2875. doi: 10.1093/humrep/del250. PMID: 16793993.
- Stanton P.G.: Regulation of the blood-testis barrier. *Sem Cell Dev Biol*. 2016, 59, 166–173. doi: 10.1016/j.semdb.2016.06.018. PMID: 27353840.
- Stańczak J., Stelmach K., Urbanowicz M.: Decrease in the number of marriages and live births in Poland. Eurostat. Dostępny w: <http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/pdfscache/46705.pdf>, 24.08.2016.
- Stone B.A., Alex A., Werlin L.B., Marrs R.P.: Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertil Steril*. 2013, 100, 952–958. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.046. PMID: 23809502.
- Urhøj S.K., Andersen P.K., Mortensen L.H., Davey Smith G., Nybo Andersen A.M.: Advanced paternal age and stillbirth rate: a nationwide register-based cohort study of 944,031 pregnancies in Denmark. *Eur J Epidemiol*. 2017a, 32 (3), 227–234. doi: 10.1007/s10654-017-0237-z. PMID: 28271174.
- Urhøj S.K., Raaschou-Nielsen O., Hansen A.V., Mortensen L.H., Andersen P.K., Nybo Andersen A.M.: Advanced paternal age and childhood cancer in offspring: A nationwide register-based cohort study. *Int J Cancer*. 2017b, 140, 2461–2472. doi: 10.1002/ijc.30677. PMID: 28257590.
- Vagnini L., Baruffi R.L., Mauri A.L., Petersen C.G., Massaro F.C., Pontes A. i wsp.: The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online*. 2007, 15, 514–519. PMID: 18028741.
- van der Horst G., du Plessis S.S.: Not just the marriage of figaro: But the marriage of who/eshre semen analysis criteria with sperm functionality. *Postępy Androl Online*. 2017, 4 (1), 6–22. [przełgądany: 12.11.2017 r.]. Dostępny w: <http://www.postepyandrologii.pl>
- Venkatesh S., Kumar R., Deka D., Deecaraman M., Dada R.: Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Syst Biol Reprod Med*. 2011, 57, 124–132. doi: 10.3109/19396368.2011.562960. PMID: 21425891.
- Vierck E., Silverman J.M.: Brief report: phenotypic differences and their relationship to paternal age and gender in autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*. 2015, 45, 1915–1924. doi: 10.1007/s10803-014-2346-9. PMID: 25526953.
- Virant-Klun I., Tomazevic T., Meden-Vrtovec H.: Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2002, 19, 319–328. PMID: 12168732.
- Walczak-Jędrzejowska R.: Stres oksydacyjny a niepłodność męska. Część I: Czynniki wywołujące stres oksydacyjny w nasieniu. *Postępy Androl Online*. 2015, 2 (1), 5–15. [przełgądany: 12.11.2017 r.]. Dostępny w: <http://www.postepyandrologii.pl>
- Wang C., Nieschlag E., Swerdloff R., Behre H.M., Hellstrom W.J., Gooren L.J. i wsp.: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Int J Androl*. 2009, 32, 1–10. doi: 10.1530/EJE-08-0601. PMID: 18955511 PMID: PMC2754.
- Ward W.S.: Eight tests for sperm DNA fragmentation and their roles in the clinic. *Transl Androl Urol*. 2017. doi: 10.21037/tau.2017.03.78. PMID: 29082163.
- Ward W.S.: Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*. 2010, 16, 30–36. doi: 10.1093/molehr/gap080. PMID: 19748904.
- Ward W.S.: Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biol Reprod*. 2011, 84, 841–843. doi: 10.1095/biolreprod.111.090951. PMID: 21248288.
- Wenda-Różewicka L., Piasecka M.: Cykl nabłonka plemnikotwórczego w jądrze człowieka. W: Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne. Red. M. Piasecka. Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, 189–193.
- Wenda-Różewicka L., Wiszniewska B.: Organizacja przestrzeni śródmiąższowej męskiej gonady. W: Układ płciowy męski. Badania kliniczne i doświadczalne. Red. M. Piasecka. Wyd. Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, 194–207.
- Whitcomb B.W., Turzanski-Fortner R., Richter K.S., Kipersztok S., Stillman R.J., Levy M.J. i wsp.: Contribution of male age to outcomes in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*. 2011, 95, 147–151. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.06.039. PMID: 20663496.
- Winkle T., Rosenbusch B., Gagsteiger F., Paiss T., Zoller N.: The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet*. 2009, 26, 41–46. doi: 10.1007/s10815-008-9277-3. PMID: 19030983.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. World Health Organization Press, Geneva 2010.
- Wu F.C., Tajar A., Beynon J.M., Pye S.R., Silman A.J., Finn J.D. i wsp.: Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med*. 2010, 363, 123–135. doi: 10.1056/NEJMoa0911101. PMID: 20554979.
- Zitzmann M.: Effects of age on male infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013, 27, 617–628. doi: 10.1016/j.beem.2013.07.004. PMID: 24054934.