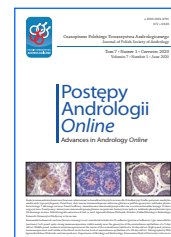




Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego

Postępy Andrologii Online**Advances in Andrology Online**<http://www.postepyandrologii.pl>

ZNACZENIE OCENY STATUSU CHROMATYNY PLEMNIKÓW LUDZKICH W WARUNKACH NATURALNEGO POCZĘCIA

THE SIGNIFICANCE OF EVALUATION OF HUMAN SPERM CHROMATIN STATUS IN NATURAL CONCEPTION

Kamil Gill *, Małgorzata Piasecka

Zakład Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

*Autor do korespondencji/corresponding author: Kamil Gill, Zakład Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, 70-210 Szczecin, ul. Żołnierska 48

tel. 91 48 00 907, e-mail: kamil.gill@pum.edu.pl

Otrzymano/received: 05.05.2020 r. Zaakceptowano/accepted: 15.06.2020 r.

DOI: [10.26404/PAO_2353-8791.2020.03](https://doi.org/10.26404/PAO_2353-8791.2020.03)

Kamil Gill – dr n. med., biolog, absolwent Uniwersytetu Szczecińskiego. Pierwszy autor i współautor artykułów naukowych, opublikowanych w renomowanych polskich i zagranicznych czasopismach naukowych. Laureat Nagrody Polskiego Towarzystwa Andrologicznego im. Prof. Bokińca. Członek Polskiego Towarzystwa Andrologicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz Polskiego Towarzystwa Biologii Rozrodu. Od 2019 r. adiunkt w Zakładzie Histologii i Biologii Rozwoju Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie.

Kamil Gill – PhD, biologist, graduate of the University of Szczecin. The first author and co-author of articles published in renowned Polish and foreign scientific journals. Winner Polish Society of Andrology Award of Prof. Bokinić for young scientists. Member of the Polish Society of Andrology, Polish Society of Cell Biology, Polish Society of Histochemistry and Cytochemistry as well as Polish Society of Reproductive Biology. Since 2019 senior lecturer in Department of Histology and Developmental Biology at Pomeranian Medical University in Szczecin.

Streszczenie

W niniejszym artykule dokonano przeglądu piśmiennictwa dotyczącego klinicznego znaczenia statusu chromatyny męskich komórek rozrodczych dla uzyskania poczęcia w warunkach naturalnych. Ponadto uwzględniono powszechnie stosowane techniki badawcze ujawniające nieprawidłowości chromatyny plemników na różnych poziomach jej organizacji (np. jedno- i dwuniciowe pęknięcia nici DNA, podwyższoną zawartość histonów, obniżoną protaminację, nieprawidłową kondensację). Opisane zostały także trzy główne teorie tłumaczące pochodzenie uszkodzeń chromatyny męskich gamet: zaburzenia reorganizacji chromatyny, „nieudana” apoptoza komórek gremialnych i stres oksydacyjny. Zwrócono także uwagę na czynniki etiologiczne odpowiedzialne za ich powstawanie (żyłaki powrózka nasienne, choroby systemowe, infekcje męskiego układu płciowego, zaburzenia hormonalne, niezdrowy styl życia, szkodliwe czynniki środowiskowe, czynniki jatrogenne, zaawansowany wiek mężczyzny). W celu zaprezentowania klinicznego znaczenia dojrzałości i integralności genomu plemników, z uwzględnieniem stosowanych przez badaczy testów, przedstawiono różnice między

mężczyznami płodnymi oraz zdrowymi ochotnikami z normozoospermia a mężczyznami niepłodnymi lub niepłodnymi pochodzącymi z par z historią nawracających poronień. Mężczyźni niepłodni mieli wyższy odsetek plemników z uszkodzonym materiałem genetycznym. Wykazano, że metody oceny statusu chromatyny miały dobrą lub bardzo dobrą wartość predykcyjną dla odróżnienia mężczyzn płodnych od niepłodnych lub od mężczyzn z par, u których doszło do utraty ciąży. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że status chromatyny plemników jest jednym z kluczowych czynników etiologicznych męskiej niepłodności.

Słowa kluczowe: chromatyna plemnika, zapłodnienie, niepłodność, poronienia

Abstract

The present paper aimed to describe the role of the sperm chromatin status in natural conception. In addition, the commonly used research techniques able to reveal abnormalities in sperm chromatin organization at various levels (e.g. single- and double-strand breaks in DNA, increase in histone content, deficiency in protamination, abnormal condensation) were included. Moreover, three main theories explaining the origin of chromatin damage in male gametes (disorders of chromatin reorganization, 'abortive' apoptosis of germinal cells, oxidative stress) were described. Additionally, the etiological factors of sperm chromatin damage (varicocele, systemic diseases, infections of the male reproductive system, hormonal disorders, unhealthy lifestyle, harmful environmental factors, iatrogenic factors, advanced paternal age) were taken to the consideration. To evaluate the clinical utility of the sperm genome maturity and integrity with particular attention on type of used laboratory methods, the differences between fertile men and healthy volunteers with normozoospermia vs. infertile ones and infertile men from couples with a history of recurrent miscarriages were discussed. The higher percentage of sperm cells with damaged genetic material was found in infertile men. Moreover, it was shown that the methods of sperm chromatin status evaluation had good or very good predictive value to distinguish fertile men from infertile or infertile male partners in couples experiencing recurrent pregnancy loss. Thus, the literature review shows that sperm chromatin status is one of the key etiological factors of male infertility.

Key words: sperm chromatin, fertilization, infertility, miscarriage

Skróty / Abbreviations

8-OHdG – 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (ang. *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*); AB – błękit aniliny (ang. *anilin blue*); AUC – pole powierzchni pod krzywą (ang. *area under curve*); ATP – adenozy-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*); BER – wycinanie par zasad azotowych (ang. *base excision repair*); CMA3 – chromomycyna A3 (ang. *chromomycin A3*); DFI – indeks fragmentacji DNA (ang. *DNA fragmentation index*); dNTP – deoksynukleotydy (ang. *deoxynucleotides*); dsSDF – dwuniciowe pęknięcia DNA (ang. *double stranded DNA fragmentation*); DTT – ditiotreitol (ang. *dithiothreitol*); EDC – związki chemiczne zaburzające gospodarkę hormonalną (ang. *endocrine disrupting chemicals/compounds*); HDS – intensywne wiązanie oranżu akrydyny (ang. *high DNA stainability*); NOX5 – oksydaza NAPH 5 (ang. *NADPH oxidase 5*), OA – oranż akrydyny (ang. *acridine orange*); OGG1 – glikozylaza 8-oksoguaniny (ang. *8-oxoguanine DNA glycosylase*); OR – iloraz szans (ang. *odds ratio*); RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*); SCD – test dyspersji chromatyny (ang. *sperm chromatin dispersion*); P1 – protamina 1 (ang. *protamine 1*); P2 – protamina 2 (ang. *protamine 2*); SCSA – test oceniający strukturę chromatyny plemników (ang. *sperm chromatin structure assay*); ssSDF – jednoniciowe pęknięcie DNA (ang. *single stranded DNA fragmentation*); TB – błękit toluidyny (ang. *toluidin blue*); TdT – terminalna transferaza deoksynukleotydów (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*); TUNEL – znakowanie końców nacięć nici DNA za pośrednictwem terminalnej transferazy deoksynukleotydowej (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*); WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

Niepłodność partnerska dotyczy 15–20% par w wieku reprodukcyjnym chcących posiadać potomstwo. Stanowi to ok. 186 mln niepłodnych par na świecie (Agarwal i wsp., 2019; Inhorn i Patrizio, 2015; Machen i Sandlow, 2020; Murshidi i wsp., 2020; Pan i wsp., 2018; Uppangala i wsp., 2016). Jest to problem nie tylko medyczny, ale także demograficzny, ekonomiczny i psychologiczny. Wiąże się on ze stale obserwowanym spadkiem dzietności w krajach rozwiniętych, wysokimi kosztami leczenia niepłodności, konsekwencjami gospodarczymi wynikającymi ze starzenia się społeczeństwa i psychologicznymi związanymi z niemożnością posiadania potomstwa (Agarwal i wsp., 2015, 2019; Chanduszko-Salska, 2016; Machen i Sandlow, 2020; Szkodziak i wsp., 2020; Vander Borcht i wsp., 2018). Szacuje się, że udział czynnika męskiego w niepłodności

partnerskiej wynosi ok. 50%. Współistnieje on z czynnikiem żeńskim w ok. 30%, a w ok. 20% jest czynnikiem izolowanym. Doniesienia z ostatnich lat ujawniają jednak, że w niektórych regionach geograficznych (Bliski Wschód) następuje zdecydowany wzrost udziału czynnika męskiego, który może wynosić aż 70% (Agarwal i wsp., 2015, 2019). Ponadto, mimo coraz większej wiedzy na temat molekularnych podstaw funkcjonowania ludzkiego organizmu i rozwoju technik weryfikujących procesy i struktury komórkowe, głównym andrologicznym narzędziem diagnostycznym wciąż pozostaje standardowa ocena seminologiczna. Jest ona przeprowadzana zgodnie z rekomendacjami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) (WHO, 2010) i interpretowana w oparciu o ustalone wartości

referencyjne. W wielu przypadkach jest niewystarczająca do precyzyjnego odróżniania mężczyzn niepłodnych od płodnych. Okazuje się bowiem, że nie zawsze mężczyźni z obniżonymi standardowymi parametrami nasienia są niepłodni i nie zawsze mężczyźni z normozoospermią są płodni. Szacuje się, że około 15% niepłodnych mężczyzn charakteryzuje się prawidłowym wynikiem podstawowego badania nasienia (Agarwal i wsp., 2015, 2019; Schulte i wsp., 2010). W takich przypadkach najprawdopodobniej mają miejsce nieprawidłowości molekularne, które mogą być przyczyną niepłodności idiopatycznej, stanowiącej aż 50% niepłodności męskiej (Agarwal i wsp., 2019). Wymagają one wprowadzenia dodatkowych i komplementarnych testów oceniających jakość męskich komórek rozrodczych na poziomie molekularnym, co niewątpliwie jest niezbędne do prawidłowego postępowania terapeutycznego.

Wyniki badań doświadczalnych i klinicznych sugerują, że istotnym biomarkerem kompetencji biologicznej plemników może być status/jakość ich chromatyny, która może wpływać na: 1) czas oczekiwania na ciążę; 2) proces zapłodnienia; 3) rozwój zarodka; 4) wzrost ryzyka wystąpienia poronień; 5) zdrowie przyszłego potomstwa (Agarwal i wsp., 2015, 2016, 2019; Cho i Agarwal, 2018; Cho i wsp., 2017; Machen i Sandlow, 2020; Sharma i wsp., 2020; van der Horst i du Plessis, 2017). Dlatego też w niniejszym artykule poddano analizie wyniki badań naukowych dotyczące klinicznego znaczenia statusu chromatyny męskich komórek rozrodczych, z uwzględnieniem zastosowanych metod badawczych.

Etiologia i patomechanizm uszkodzeń chromatyny plemników

Uszkodzenia chromatyny plemników mogą przejawiać się na różnych poziomach jej organizacji. Ujawnia się: 1) jednoniciowe i dwuniciowe pęknięcia nici DNA; 2) niedojrzałość chromatyny związanej z zaburzoną jej przebudową podczas spermiogenezy obejmującą m.in. zastępowanie histonów jądrowych przez specyficzne białka chromatyny plemnika – protaminy 1 (P1, ang. *protamine 1*) i 2 (P2, ang. *protamine 2*) w procesie protaminacji; 3) nieprawidłową trzeciorzędową strukturę chromatyny, wyrażającą się nieprawidłową jej kondensacją. Wymienione zaburzenia mogą być izolowane lub współistniejące. W celu ich wykazania należy zastosować komplementarne, wzajemnie uzupełniające się testy (Henkel i Leisegang, 2020; Panner Selvam i wsp., 2020; Ribas-Maynou i Benet, 2019; Sharma i wsp., 2020; Ward, 2017).

Molekularny patomechanizm prowadzących do nieprawidłowości w obrębie struktury chromatyny plemników nie jest w pełni poznany. Istnieją jednak trzy główne teorie tłumaczące pochodzenie jej uszkodzeń: 1) zaburzenia przebudowy chromatyny; 2) „nieudana” apoptoza (ang. *‘abortive’ apoptosis*) komórek gremialnych; 3) stres oksydacyjny (rycina 1) (Agarwal i Sengupta, 2020;

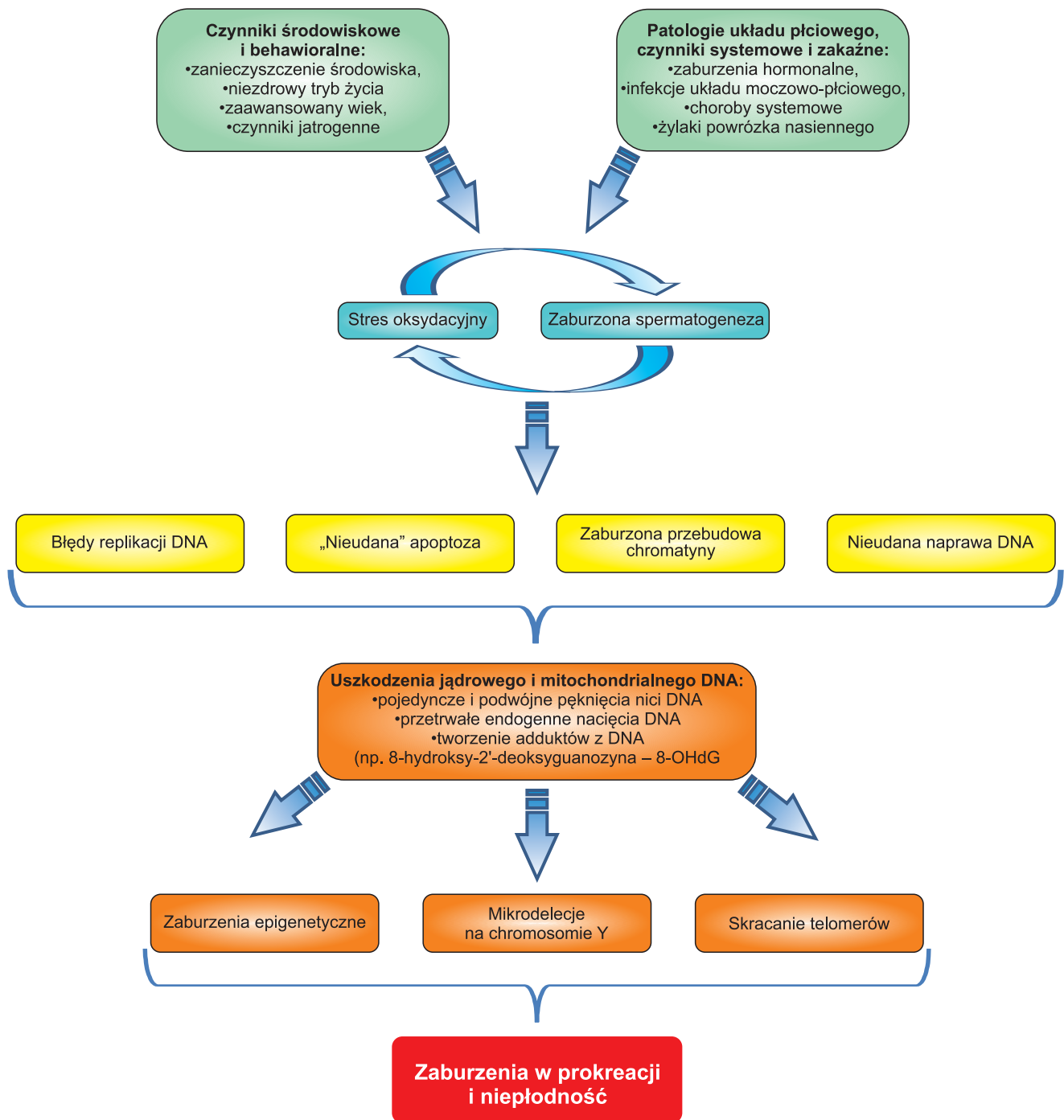
Bui i wsp., 2018; Cho i Agarwal, 2018; Majzoub i wsp., 2020; Muratori i wsp., 2019; Panner Selvam i wsp., 2020; Sakkas i El-Fakahany, 2018; Sakkas i wsp., 2003; Schulte i wsp., 2010; Sharma i wsp., 2020; Ward, 2017).

Zaburzenia przebudowy chromatyny

Nukleoproteinowy kompleks tworzący chromatynę plemników jest unikatowy. Zawiera on DNA upakowany w formie nukleosomów charakterystycznych dla komórek somatycznych oraz toroidów specyficznych dla męskich gamet. Jedynie 5–15% chromatyny związanych jest z histonami budującymi nukleosomy zawierające oktamer histonów (histony: H2A, H2B, H3 i H4), na który nawinięta jest helisa DNA. Natomiast pozostała część chromatyny zorganizowana jest w postaci toroidów, w skład których nie wchodzi histony, tylko protaminy. Białka te cechuje wysoka zawartość cysteiny i argininy, co warunkuje silną kondensację DNA. Toroidy tworzone są przez ściśle upakowane spiralne pętle DNA (50–100 kpz – tysiąc par zasad). Struktury te powiązane są ze sobą za pomocą łącznikowych pętli DNA (ang. *toroid linker*) o długości poniżej 1000 pz (par zasad). Pętle te nie tylko integrują sąsiadujące ze sobą toroidy, ale również wiążą je z włóknami macierzy jądrowej. Toroidy ściśle do siebie przylegają bocznymi powierzchniami i tworzą chromatynowe struktury wyższego rzędu. Taka organizacja chromatyny sprawia, że materiał genetyczny plemnika jest 6–20-krotnie mocniej skondensowany niż ten znajdujący się w komórkach somatycznych (Björndahl i Kvist, 2014; Patankar i Parte, 2017; Ward, 2017).

Aby proces przebudowy chromatyny męskich komórek rozrodczych był możliwy, konieczne są modyfikacje epigenetyczne histonów somatycznych spermatocytów (fosforylacja, ubikwitynacja, sumoilacja, ADP-rybozylacja, metylacja) i histonów jądrowych wydłużających się spermatyd (np. hiperacetylacja histonu H4). Pierwsze z nich umożliwiają usunięcie histonów somatycznych okrągłej spermatydy i wbudowanie histonów jądrowych. Z kolei hiperacetylacja histonu H4 powoduje rozluźnienie struktury chromatyny. Z jednej strony promuje to wymianę histonów jądrowych na białka przejściowe TP1 i TP2, które w wydłużających się spermatydach zastępowane są przez P1 i P2 (proces protaminacji), z drugiej natomiast sprzyja uszkodzeniu DNA. Należy podkreślić, że usunięcie histonów jądrowych i wbudowanie białek przejściowych, a następnie protamin wymaga także aktywności topoizomerazy II, która odpowiedzialna jest za powstanie fizjologicznych przejściowych podwójnych nacięć nici DNA (Hao i wsp., 2019; Henkel i Leisegang, 2020; Ward, 2017).

W końcowym etapie reorganizacji materiału genetycznego plemnika wolne końce DNA podlegają ligacji (łączeniu) katalizowanej także przez topoizomerazę II. Wynika z tego, że dojrzała chromatyna plemnika przy prawidłowej aktywności topoizomerazy II zawiera



Ryc. 1. Sugerowany patomechanizm uczestniczący w uszkodzeniach DNA plemników oraz konsekwencje tych nieprawidłowości (szczegóły w tekście)

integralny DNA, tym bardziej, że enzym ten również zaangażowany jest w naprawę materiału genetycznego. Funkcja tego enzymu jest kontrolowana przez polimerazę poli (ADP-rybozy), która jest aktywowana w obecności nacięć nici DNA. Rozważana jest hipoteza mówiąca o tym, że w przypadku nieprawidłowej aktywności tych enzymów może dojść do pojawienia się tzw. przetrwałych endogennych nacięć nici DNA, konsekwencją czego może być obecność w ejakulacie plemników z pofragmentowanym DNA (Henkel i Leisegang, 2020; McPherson i Longo, 1992; Muratori i wsp., 2019; Schulte i wsp., 2010).

Co więcej, po zakończonej protaminacji ma miejsce dalsza kondensacja i stabilizacja struktury chromatyny, która przede wszystkim zachodzi w najądrzu i jest efektem tworzenia się mostków dwusiarczkowych (S–S) wewnątrz cząsteczek protamin i pomiędzy nimi. Należy podkreślić, że procesy te chronią materiał genetyczny przed uszkodzeniami, co wydaje się niezwykle istotne ze względu na brak systemów naprawczych DNA w dojrzałym plemniku. Zatem zaburzenia protaminacji i stabilizacji struktury chromatyny predysponują do powstania uszkodzeń jądrowego DNA.

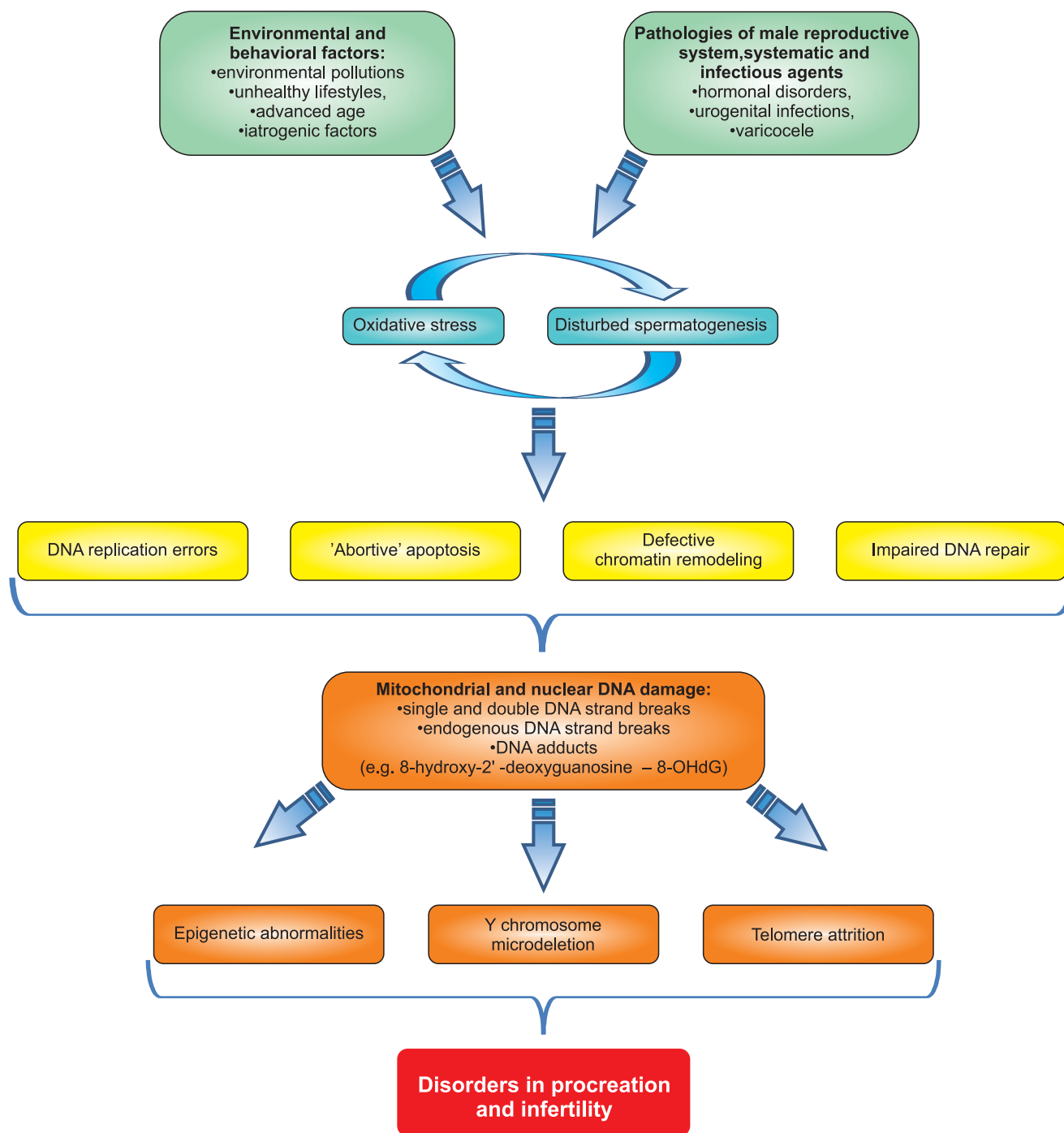


Fig. 1. Suggested pathomechanism involved in sperm DNA damage and the consequences of these abnormalities (details in text)

Wielu autorów ujawnia silną korelację między nieprawidłowo skondensowaną chromatyną plemnika (np. zwiększona zawartość histonów jądrowych, obniżona protaminacja, nieprawidłowy stosunek P1/P2) a uszkodzeniami jego jądrowego DNA (*Bianchi i wsp.*, 1993; *Evenson*, 1990; *Gorczyca i wsp.*, 1993; *Henkel i Leisegang*, 2020; *Javed i wsp.*, 2019; *Manicardi i wsp.*, 1995). Ponadto wykazano związek między integralnością genomu plemników a obniżonymi standardowymi parametrami seminologicznymi. Obecnie uważa się, że nieprawidłowa dojrzałość chromatyny plemnika i obniżona jej integralność mogą być wskaźnikiem zaburzeń spermatogenezy (*Gill i wsp.*,

2019a, 2019b; *Henkel i Leisegang*, 2020; *Jakubik-Uljasz i wsp.*, 2020; *Lopes i wsp.*, 1998; *McPherson i Longo*, 1992; *Rosiak-Gill i wsp.*, 2019) (rycina 1).

■ „Nieudana” apoptoza

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, jest procesem zachodzącym w wielu komórkach ludzkiego organizmu, w tym w komórkach germinalnych. Ma ona szczególne znaczenie, gdyż jej efektywność gwarantuje selektywną eliminację komórek, w tym z wadliwym

materiałem genetycznym, co w konsekwencji zmniejsza ryzyko zapłodnienia komórki jajowej plemnikiem nieprawidłowym. Ponadto zdolności komórek Sertolego do podtrzymywania komórek linii spermatogenicznej są ograniczone i eliminacja tych niedoskonałych jest wysoce uzasadniona, zwłaszcza w przypadku tworzenia bariery krew-jądro. Szacuje się, że u ssaków nawet 75% komórek germinalnych podlega temu procesowi (*Sakkas i wsp., 2003; Schulte i wsp., 2010; Ward, 2017*). Jedną z hipotez tłumaczących powstawanie uszkodzeń genomu plemników jest zjawisko określane terminem „nieudana” apoptoza (ang. *‘abortive’ apoptosis*). Sugeruje się, że komórki, które weszły na szlak apoptozy z powodu m.in. uszkodzeń DNA (np. błędy replikacji DNA, nieudana naprawa DNA), mogą z niego „uciec” i finalnie nie podlegają eliminacji. Przemawia za tym fakt, iż u niepłodnych mężczyzn stwierdza się wysoki odsetek plemników z obniżoną jakością DNA, co zgodnie z tą hipotezą może być związane z aktywacją endonukleaz degradujących DNA podczas apoptozy. Jednocześnie w plemnikach tych stwierdza się ekspresję białek zaangażowanych w proces apoptozy: receptora śmierci FAS, białka p53, Bcl-2, polimerazy poli (ADP-rybozy) oraz kaspaz – kluczowych dla apoptozy proteinaz cysteinowych. Ponadto na powierzchni tych komórek ujawnia się obecność fosfolipidu fosfatydyloseryny – markera wczesnej apoptozy. Patomechanizm związany z „nieudaną” apoptozą nie został do końca wyjaśniony. Przypuszcza się, że ma miejsce nadekspresja białek antyapoptotycznych (np. Bcl-2 i Bcl-x). Brak równowagi między białkami pro- i antyapoptotycznymi może przyczynić się do zaburzeń spermatogenezy. Zwraca się także uwagę, że zawartość ligandu FAS prawdopodobnie jest zbyt mała, jak również sygnalizacja komórkowa przez receptor FAS i inne receptory nie funkcjonuje w sposób poprawny, zwłaszcza przy bardzo intensywnej spermatogenezie prowadzącej do produkcji nawet 200×10^6 plemników dziennie. W efekcie opisanych zjawisk zwiększa się liczba nieprawidłowych komórek rozrodczych w ejakulacie. Uważa się, że w takich przypadkach ma miejsce brak synchronizacji spermatogenezy z apoptozą (*Ammar i wsp., 2019; Henkel i Leisegang, 2020; Muratori i wsp., 2006, 2019; Panner Selvam i wsp., 2020; Sakkas i El-Fakahany, 2018; Sakkas i wsp., 2003; Schulte i wsp., 2010; Simon i wsp., 2017; Ward, 2017*).

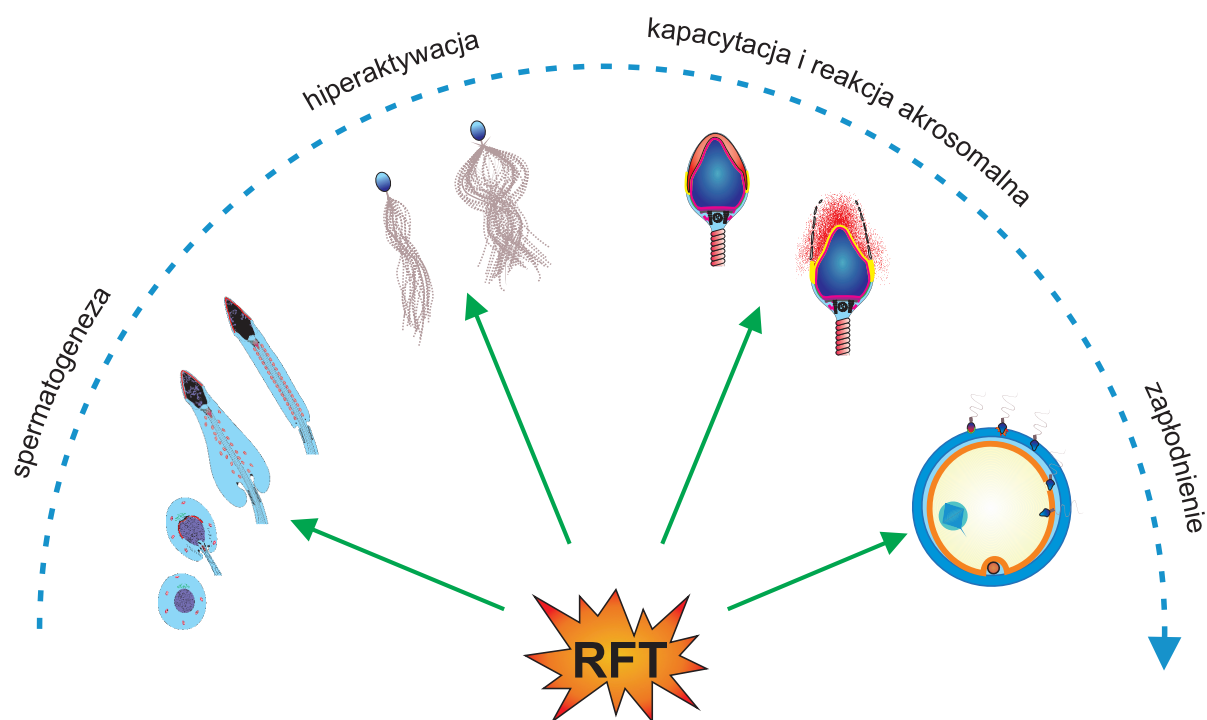
■ Stres oksydacyjny i reaktywne formy tlenu

Równowaga oksydacyjno-redukcyjna (redoks) nasienia jest niezwykle istotna dla funkcjonowania plemników. Reaktywne formy tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*) biorą udział m.in. w procesie spermatogenezy, kapacytacji, hiperaktywacji, reakcji akrosomalnej i fuzji plemnika z oocytem, które są niezbędnymi etapami na drodze do uzyskania zapłodnienia (rycina 2) (*Adewoyin i wsp., 2017; Agarwal i Sengupta, 2020; Aitken, 2020; Aitken i Drevet, 2020; Aitken i wsp., 2015*). Zaburzenie tego

balansu, poprzez nadmierne generowanie wolnych rodników i/lub niewydolność systemów antyoksydacyjnych, może prowadzić do powstania stanu stresu oksydacyjnego, którego konsekwencjami mogą być zaburzenia spermatogenezy i uszkodzenia plemników, w tym ich DNA. Jest to bardzo istotny problem, ponieważ szacuje się, że nawet 80% mężczyzn z niepłodnością idiopatyczną ma podwyższoną zawartość RFT w nasieniu. Dlatego też wielu autorów wskazuje stres oksydacyjny nasienia jako istotny czynnik etiologiczny niepowodzeń w rozrodzie (*Agarwal i wsp., 2019; Agarwal i Sengupta, 2020; Aitken i Drevet, 2020; Aitken i wsp., 2015; Elbardisi i wsp., 2020; Henkel i Leisegang, 2020; Henkel i Solomon, 2018; Majzoub i wsp., 2018, 2020; Simon i wsp., 2017*) (rycina 1).

Zaburzenia równowagi redoks wpływają na męską płodność poprzez peroksydację błon lipidowych męskich gamet, która prowadzi do powstania cytotoksycznych aldehydów, np. 4-hydroksynonenalu (4HNE, ang. *4-hydroxynonenal*) i akroleiny. Ponadto ma miejsce oksydacja białek oraz DNA powodująca jego fragmentację i powstawanie w nim adduktów, np. 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG, ang. *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*) (rycina 1). Warto również zaznaczyć, że plemniki wykazują aktywność tylko jednego enzymu odpowiedzialnego za naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA, którym jest glikozylaza 8-oksoguaniny (OGG1, ang. *8-oxoguanine DNA glycosylase*) (*Aitken i Drevet, 2020; Henkel i Leisegang, 2020*). Enzym ten katalizuje usuwanie 8-OHdG oraz naprawę DNA poprzez wycinanie par zasad azotowych (BER, ang. *base excision repair*). Co ciekawe, aktywność tego enzymu hamowana jest m.in. przez kadm zawarty w dymie papierosowym. Stąd też u palaczy obserwuje się wyższy poziom uszkodzeń DNA, w tym 8-OHdG. Może to nie tylko negatywnie wpływać na płodność, ale również na zdrowie przyszłych pokoleń. U potomstwa mężczyzn palących papierosy istotnie częściej stwierdza się złośliwe nowotwory, na co – jak sugerują – badacze ma wpływ jakość DNA plemników w momencie zapłodnienia (*Aitken i Baker, 2013; Aitken i Drevet, 2020; Aitken i wsp., 2015; Henkel i Leisegang, 2020*).

Należy podkreślić, że jednym z głównych źródeł RFT w nasieniu są plemniki. Reaktywne formy tlenu powstają w mitochondriach wstawki plemnika, na poziomie łańcucha oddechowego zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Rolą tego łańcucha jest wytworzenie źródła energii w postaci adenosyno-5'-trifosforanu (ATP, ang. *adenosine-5'-triphosphate*). Obok ATP wytwarzane są także RFT (anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, nadtlenek wodoru i tlen singletowy), które w przypadku dysfunkcji i uszkodzeń mitochondriów mogą być nadmiernie generowane, powodując stres oksydacyjny zarówno w matriksie mitochondrialnej, jak i w cytozolu komórki (*Aitken, 2020; Aitken i Drevet, 2020; Idelchik i wsp., 2017*). Warto zaznaczyć, że nadmiar RFT pochodzący z mitochondriów może indukować apoptozę komórek rozrodczych poprzez aktywację kaspaz (wewnętrzny szlak apoptozy)



Ryc. 2. Wybrane procesy fizjologiczne, związane z męskimi komórkami rozrodczymi, stymulowane przez reaktywne formy tlenu (RFT)

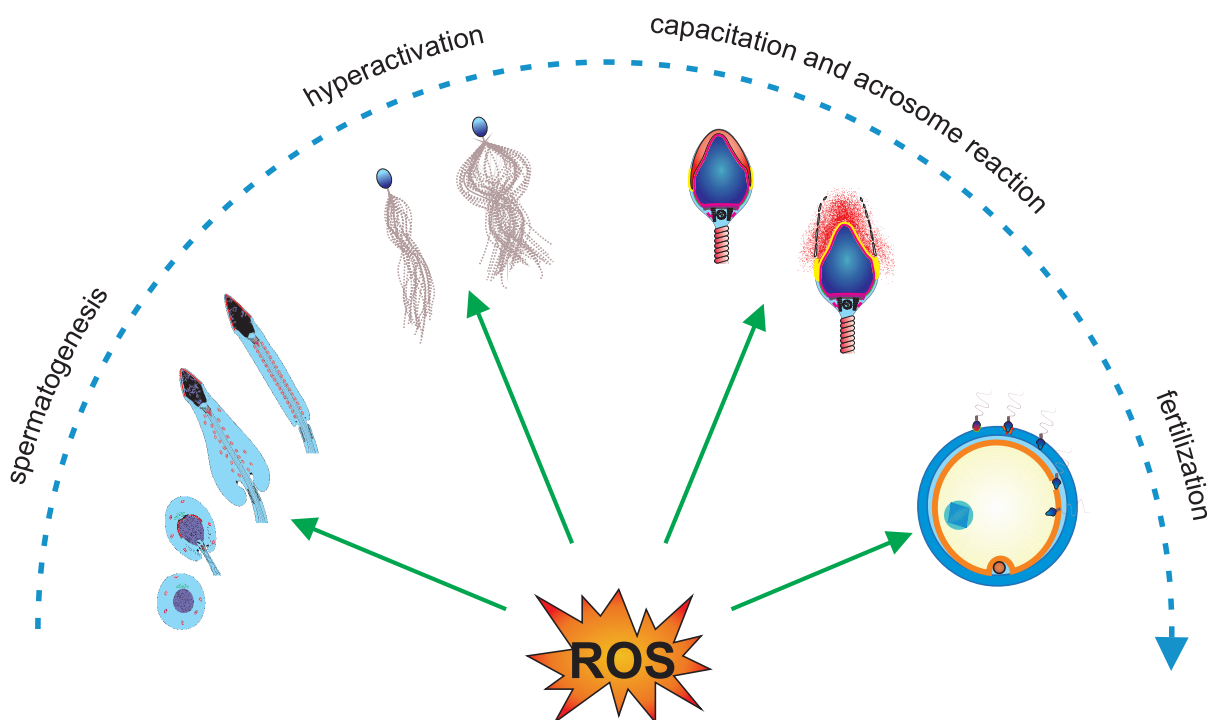


Fig. 2. Selected physiological processes related to male germ cells, stimulated by reactive oxygen species (ROS)

(Aitken, 2020; Aitken i Baker, 2013; Aitken i Drevet, 2020; Grunewald i wsp., 2005). Ponadto źródłem RFT są także niedojrzałe formy plemników, szczególnie te posiadające resztkową cytoplazmę bogatą w błonową oksydazę zależną od NADPH (identyfikowaną jako NOX5, ang. *NADPH oxidase 5*). Enzym ten zaangażowany jest

w intensywną generację RFT, głównie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru (Aitken i Drevet, 2020; Vatannejad i wsp., 2019). Podczas wędrówki męskich gamet przez najądrze dochodzi do bliskiego kontaktu ich form niedojrzałych z prawidłowymi, co skutkuje wzrostem ryzyka uszkodzenia plemnikowego DNA.

Za stres oksydacyjny nasienia mogą być także odpowiedzialne leukocyty, których mechanizmem obronnym jest uwalnianie dużej ilości RFT podczas wybuchu tlenowego. Ponieważ jest to nieswoista i nieselektywna odpowiedź immunologiczna, uszkodzeniu ulegają nie tylko patogeny znajdujące się w nasieniu, ale również plemniki, tym bardziej że zdolność antyoksydacyjna nasienia jest niska (Agarwal i wsp., 2019; Agarwal i Sengupta, 2020; Aitken i Drevet, 2020; Henkel i Solomon, 2018; Majzoub i wsp., 2020).

Opisane powyżej zjawiska wskazują, że RFT mogą uszkadzać DNA plemników nie tylko w sposób bezpośredni (oksydacyjne uszkodzenie DNA), ale także pośredni, bowiem w obecności RFT ma miejsce aktywacja kaspaz i endonukleaz (nieoksydacyjne uszkodzenie DNA).

Czynniki etiologiczne uszkodzeń chromatyny

Poza wymienionymi trzema głównymi teoriami tłumaczącymi powstawanie uszkodzeń DNA plemników istnieje szerokie spektrum osobniczo zależnych endo- i egzogennych czynników etiologicznych, które wpływają negatywnie na proces spermatogenezy. Zaliczyć do nich można m.in.: 1) niewydolność układu krążenia, w tym żylaki powrózka nasiennego; 2) choroby systemowe, takie jak cukrzyca, nowotwory; 3) przewlekłe infekcje, szczególnie prostaty i innych gruczołów dodatkowych męskiego układu płciowego; 4) zaburzenia hormonalne; 5) niezdrowy styl życia, w tym brak aktywności fizycznej, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu i innych środków odurzających oraz nadwaga; 6) szkodliwe czynniki środowiskowe, w tym promieniowanie jonizujące, toksyny czy też związki chemiczne zaburzające gospodarkę hormonalną (związki endokrynnie czynne, EDC, ang. *endocrine disrupting chemicals/compounds*); 7) czynniki jatrogenne takie jak krioprezervacja nasienia; 8) zaawansowany wiek mężczyzny (>35.–40. r.ż.) i wynikająca z niego obniżona sprawność systemów naprawy DNA i antyoksydacyjnych. Warto również podkreślić, że patomechanizm uszkodzenia DNA plemników w wyniku wymienionych czynników w większości związany jest ze stresem oksydacyjnym (rycina 1) (Bui i wsp., 2018; Cho i Agarwal, 2018; Elbardisi i wsp., 2020; Henkel i Leisegang, 2020; Panner Selvam i wsp., 2020; Ribas-Maynou i Benet, 2019; Sakkas i El-Fakahany, 2018; Schulte i wsp., 2010; Simon i wsp., 2017).

Znaczenie uszkodzeń chromatyny plemników w przypadkach naturalnej koncepcji z uwzględnieniem zastosowanych testów

Test z błękitem aniliny i błękitem toluidyny

Testy z błękitem aniliny (AB, ang. *aniline blue*) i błękitem toluidyny (TB, ang. *toluidine blue*) weryfikujące dojrzałość chromatyny plemników przeważnie stosowane

są w badaniach naukowych. Nie mają one jednak statusu testów diagnostycznych. Test AB ujawnia plemniki ze zwiększoną zawartością histonów jądrowych (plemniki AB-pozytywne), gdyż barwnik ten wiąże się z rodnikiem aminokwasu lizyny występującej w histonach. Z kolei TB łącząc się z grupami fosforanowymi łańcuchów polinukleotydowych DNA, pozwala na wykazanie plemników z nieprawidłową strukturą/kondensacją chromatyny (plemniki TB-pozytywne) (Agarwal i wsp., 2016; Erenpreiss i Zubkova, 2018; Kazerooni i wsp., 2009; Schulte i wsp., 2010; Sharma i wsp., 2020).

Kliniczne znaczenie oceny dojrzałości chromatyny plemników z wykorzystaniem AB i TB zweryfikowali Pourmasumi i wsp. (2019). Autorzy ci wykazali, że mężczyźni z normozoospermia rozważani jako potencjalnie płodni mieli istotnie niższy odsetek plemników AB- i TB-pozytywnych (odpowiednio średnie: 49,75% oraz 58,95%) w porównaniu do całej analizowanej populacji mężczyzn niepłodnych (odpowiednio średnie: 54,29% oraz 62,52%), do wyselekcjonowanej grupy mężczyzn z niepłodnością idiopatyczną (odpowiednio średnie: 51,35% oraz 60,95%), z oligozoospermia (odpowiednio średnie: 67,76% oraz 69,76%), astenozoospermia (odpowiednio średnie: 58,71% oraz 64,17%) i z oligoastenozoospermia (odpowiednio średnie: 67,49% oraz 71,00%). Podobne wyniki uzyskali również inni autorzy, którzy wykazali, że mężczyźni płodni z normozoospermia mieli istotnie niższy odsetek plemników TB-pozytywnych niż niepłodni (średnie: 24,00% vs. 47,00%) lub niepłodni z astenoteratozoospermia (średnie: 30,88% vs. 61,37%) (Ajina i wsp., 2017; Tsarev i wsp., 2009). Ponadto wykazano istotne różnice w odsetkach plemników AB- i TB-pozytywnych między grupą mężczyzn płodnych (odpowiednio średnie: 15,75% i 16,70%), niepłodnych z żylakami powrózka nasiennego (odpowiednio średnie: 40,95% i 60,85%) i niepłodnych bez żylaków powrózka nasiennego (odpowiednio średnie: 40,60% i 33,50%) (Talebi i wsp., 2008). Co więcej, wykazano, że zdrowi ochotnicy z normozoospermia mieli istotnie niższy odsetek plemników nie tylko AB-pozytywnych, ale i TB-pozytywnych (odpowiednio średnie: 24,20% i 29,10% oraz 30,20% i 32,80%) niż mężczyźni niepłodni z urazami rdzenia kręgowego (odpowiednio średnie: 52,45% i 63,54%) oraz mężczyźni z częściową lub całkowitą globozoospermia (odpowiednio średnie: 81,30% i 79,80% oraz 73,10% i 86,30%) (Talebi i wsp., 2013, 2018).

Analiza krzywej ROC (ang. *receiver operating characteristic*) i pola powierzchni pod krzywą (AUC, ang. *area under curve*)¹ wykazała satysfakcjonującą wartość predykcyjną testu TB (AUC = 0,750) dla odróżnienia mężczyzn płodnych od niepłodnych. Wartość graniczną stanowiło 42% plemników TB-pozytywnych, co sugerowało, że u mężczyzn z odsetkiem plemników >42%

1 Analiza krzywej ROC i pola powierzchni pod krzywą jest narzędziem statystycznym oceniającym potencjał danego testu dla odróżnienia dwóch badanych populacji w zależności od posiadania danej cechy/wystąpienia zjawiska (np. płodny/niepłodny, ciąża/poronienie).

istniało istotnie wyższe ryzyko niepłodności. Co więcej, kobiety z par, w których mężczyźni mieli >45% plemników TB-pozytywnych, miały 7,2-krotnie mniejsze szanse (OR, ang. *odds ratio*) na zajście w ciążę w porównaniu z kobietami z par, w których mężczyźni mieli ≤45% plemników TB-pozytywnych (Tsarev i wsp., 2009). Wykazano również różnice w odsetkach plemników AB- i TB-pozytywnych mężczyzn z par, u których zdiagnozowano ≥3 nieuzasadnione nawracające poronienia w odniesieniu do mężczyzn płodnych (Kazerooni i wsp., 2009; Talebi i wsp., 2012). Wykazano, że mężczyźni z tej pierwszej grupy mieli istotnie wyższy odsetek plemników AB-pozytywnych (odpowiednio średnie: 25,90% i 46,84% vs. 13,00% i 28,12%) i TB-pozytywnych (odpowiednio średnie: 63,51% vs. 28,82%).

Test dyspersji chromatyny plemników

Diagnostyczny test dyspersji chromatyny plemników (SCD, ang. *sperm chromatin dispersion*) (Halosperm G2® test) pozwala na zidentyfikowanie plemników, których chromatyna nie podlega dyspersji po denaturacji (komórki z pofragmentowanym DNA) (Agarwal i wsp., 2016; Fernández i wsp., 2018; Majzoub i wsp., 2020; Schulte i wsp., 2010; Sharma i wsp., 2020; Simon i wsp., 2017).

Badania wielu autorów ujawniają, że mężczyźni płodni mają istotnie niższy odsetek plemników z pofragmentowanym DNA (SDF, ang. *sperm DNA fragmentation*) (np. średnie: 10,80%, 10,83%, 11,54%, 17,46%) niż mężczyźni niepłodni (np. średnie: 20,40%, 25,70%, 33,00%), niepłodni z astenozoospermia (średnia: 18,76%), astenoteratozoospermia (średnia: 25,23%), oligozoospermia (średnia: 23,31%), oligoastenozoospermia (średnia: 24,54%) i z oligoastenoteratozoospermia (średnie: 24,64 i 47,30%) (Chohan i wsp., 2006; Choucair i wsp., 2016; Evgeni i wsp., 2015; Fernández i wsp., 2005; Majzoub i wsp., 2018; Wiweko i Utami, 2017; Zhang i wsp., 2010). Podobne wyniki uzyskano również w przypadku badań autorских, w których stwierdzono istotnie niższy odsetek SDF w grupie zdrowych mężczyzn z normozoospermia w porównaniu z mężczyznami niepłodnymi (mediany: 14,00% vs. 23,00%) (Gill i wsp., 2019b). Należy jednak podkreślić, że nie zawsze podwyższonemu odsetkowi plemników z pofragmentowanym DNA towarzyszą zaburzenia podstawowych parametrów nasienia. Stwierdzono bowiem, że pomimo normozoospermii potwierdzonej u mężczyzn niepłodnych odsetek ten był istotnie wyższy (średnia: 27,30%) w porównaniu z mężczyznami płodnymi (średnia: 16,30%) (Fernández i wsp., 2005). Zatem standardowa analiza nasienia nie może być jedynym kryterium definiującym potencjał reprodukcyjny nasienia.

Wyższy odsetek SDF, w porównaniu z mężczyznami płodnymi lub zdrowymi ochotnikami z normozoospermia, ujawnia się także w grupie mężczyzn niepłodnych z infekcjami układu moczowo-płciowego spowodowanymi przez *Chlamydia trachomatis* i *Mycoplasma* (średnia: 35,22%) (Gallegos i wsp., 2008),

z żyłakami powrózka nasiennego (średnia: 25,54%) (Cortés-Gutiérrez i wsp., 2016), z częściową lub całkowitą globozoospermia (średnie: 61,70% i 57,80%) (Talebi i wsp., 2018), jak również w przypadku mężczyzn z par, u których stwierdzono idiopatyczne nawracające poronienia (średnia: 19,28%) (Ribas-Maynou i wsp., 2012b). Jednak mimo licznych dowodów naukowych potwierdzających kliniczne znaczenie SDF opublikowane zostały także wyniki badań, które nie wykazały istotnych różnic między grupą mężczyzn płodnych a grupą mężczyzn, których partnerki zaszły w ciążę spontaniczną lub wspomaganą medycznie, ale ciąża nie zakończyła się urodzeniem żywego dziecka (Evgeni i wsp., 2015).

Niektórzy autorzy podjęli próbę określenia wartości predykcyjnej testu SCD. Analizując krzywą ROC, uzyskano dobrą wartość predykcyjną tego testu (AUC = 0,862, 0,871 i 0,899) dla odróżnienia mężczyzn płodnych od niepłodnych. Wartość graniczna odsetka plemników z pofragmentowanym DNA, powyżej której istniało wysokie ryzyko niepłodności, dla poszczególnych AUC wynosiła odpowiednio: 26,10%, 24,74% i 22,50% (Javed i wsp., 2019; Ribas-Maynou i wsp., 2012b; Wiweko i Utami, 2017). Ponadto wykazano dobrą wartość predykcyjną (AUC = 0,814) testu dyspersji chromatyny odróżniającą mężczyzn płodnych od tych z par, u których stwierdzono idiopatyczne nawracające poronienia. W badaniach tych wartością graniczną, powyżej której istotnie rosło ryzyko utraty ciąży, było 18,50% SDF (Ribas-Maynou i wsp., 2012b). Z kolei badania autorskie ujawniły satysfakcjonującą wartość testu SCD, gdy analizowano fragmentację plemnikowego DNA zdrowych ochotników z normozoospermia i mężczyzn z nieprawidłowymi podstawowymi parametrami seminologicznymi (AUC = 0,753) lub też gdy porównywano mężczyzn z normozoospermia i mężczyzn niepłodnych (AUC = 0,785) (Gill i wsp., 2019a, 2019b). Co ciekawe, w badaniach tych wykazano, że wartością graniczną odróżniającą obie populacje mężczyzn było odpowiednio 18% i 20% SDF, podobnie jak w przypadkach wspomnianych wcześniej poronień (Ribas-Maynou i wsp., 2012b). Ponadto ryzyko wystąpienia nieprawidłowych parametrów seminologicznych w grupie mężczyzn z >18% SDF było ponad 5-krotnie wyższe (OR: 5,394) niż w grupie mężczyzn z ≤18% SDF (Gill i wsp., 2019a). Co więcej, w grupie mężczyzn niepłodnych ryzyko wystąpienia >20% SDF było ponad 6,5-krotnie wyższe (OR: 6,5909) niż w grupie zdrowych ochotników z normozoospermia (Gill i wsp., 2019b).

Biorąc pod uwagę opisane wyniki badań, w których wykorzystuje się test dyspersji chromatyny plemników, szansa na ciążę uzyskaną drogą naturalną może zmniejszać się już w przypadku wartości SDF >18%, która jest wartością niższą od wartości 30% uznanej przez producenta testu SCD jako wartość graniczna, powyżej której zmniejsza się potencjał płodności mężczyzn. Wydaje się zatem, że badani z SDF >18%, a w szczególności >20%, mogą wymagać interwencji terapeutycznej w celu osiągnięcia sukcesu rozrodczego. Zatem wynik SDF już

w przedziale 18–30% może mieć znaczenie kliniczne dla osiągnięcia sukcesu reprodukcyjnego.

Test z wykorzystaniem fluorochromu chromomycyny A3

Fluorochrom chromomycyny A3 (CMA3, ang. *chromomycin A3*) wykazuje powinowactwo do tych obszarów nici DNA, które bogate są w sekwencje guanina-cytosyna (G-C), z którymi wiążą się protaminy. Tym samym test ten pozwala na weryfikację plemników z obniżoną protaminacją chromatyny (komórki CMA3-pozytywne) (Agarwal i wsp., 2016; Erenpreiss i Zubkova, 2018; Kazerooni i wsp., 2009; Schulte i wsp., 2010; Sharma i wsp., 2020).

Wykazano, że mężczyźni płodni lub zdrowi ochotnicy z normozoospermia mają istotnie niższy odsetek gamet CMA3-pozytywnych (np. średnie: 13,00%, 14,35%, 21,10%, 24,43%, mediana: 25,00%) niż mężczyźni niepłodni (np. średnie: 47,82, 55,80%), niepłodni z oligozoospermia (średnia: 33,00%), astenozoospermia (średnia: 45,00%), oligoastenozoospermia (średnia: 62,00%), oligoastenoteratozoospermia (mediana: 41,00%), częścią (średnie: 49,70 i 60,10%) lub całkowitą globozoospermia (średnia: 68,60%), żyłakami powrózka nasennego (średnia: 57,15%) i z urazami rdzenia kręgowego (średnia: 49,95%) (Darmishonnejad i wsp., 2020; Hosseinifar i wsp., 2015; Kazerooni i wsp., 2009; Nasr-Esfahani i wsp., 2009; Nili i wsp., 2009; Talebi i wsp., 2008, 2012, 2013, 2016, 2018; Zandemami i wsp., 2012). Co więcej, wykazano, że nieprawidłowa protaminacja chromatyny plemników może być przyczyną poronień. U mężczyzn z par, u których stwierdzono nawracające poronienia, ujawniono istotnie wyższy odsetek plemników CMA3-pozytywnych (średnie: 25,90% i 42,35%) niż u mężczyzn płodnych (Kazerooni i wsp., 2009; Talebi i wsp., 2016). Warto również zaznaczyć, że test CMA3 uzyskał dobrą wartość prognostyczną (AUC = 0,855) dla dyskryminacji grupy mężczyzn płodnych i niepłodnych. W badaniach tych wartość graniczną stanowiło 61,00% plemników CMA3-pozytywnych (Nasr-Esfahani i wsp., 2009).

Test kometowy

Test kometowy (ang. *comet assay*) umożliwia bezpośrednią ocenę nacięć DNA podczas jego elektroforezy w żelu agarozowym. W analizie tej chromatynę plemników poddaje się działaniu soli o dużym stężeniu (w celu usunięcia białek związanych z DNA) oraz działaniu ditio-treitolu (DTT, ang. *dithiothreitol*) (redukcja mostków S–S). Wyróżnia się dwa warianty testu, pierwszy przeprowadzany jest w warunkach wysokiego pH (alkaliczny test kometowy, denaturacja przy pH >13), drugi przy pH neutralnym (obojętny/neutralny test kometowy, brak denaturacji). Alkaliczny test kometowy umożliwia zarówno weryfikację jednoniciowych pęknięć nici DNA (ssSDF, ang. *single stranded DNA fragmentation*), jak i podwójnych (dsSDF, ang. *double stranded DNA fragmentation*), natomiast neutralny jedynie dsSDF. Jednakże nie jest to metoda mająca status testu diagnostycznego

(Agarwal i wsp., 2016; Cortés-Gutiérrez i wsp., 2018; Majzoub i wsp., 2020; Schulte i wsp., 2010; Sharma i wsp., 2020; Simon i wsp., 2017; Sheikh i wsp., 2008).

Stosując alkaliczną odmianę testu kometowego, wykazano, że mężczyźni płodni mieli istotnie niższy stopień uszkodzeń DNA² (średnie: 21,10% i 30,40%) niż mężczyźni niepłodni (średnia: 68,22%), niepłodni z astenozoospermia (średnia: 45,00%), oligozoospermia (średnia: 33,00%), astenoteratozoospermia bez i z żyłakami powrózka nasennego (odpowiednio średnie: 60,52% i 78,98%), oligoastenozoospermia (średnia: 62,00%), oligoastenoteratozoospermia (średnia: 60,81%) oraz z translokacjami chromosomowymi (średnia: 73,24%). Stosując również neutralny test kometowy, uzyskano podobne różnice (Nili i wsp., 2009; Ribas-Maynou i wsp., 2012a). Ponadto badania (Enciso i wsp., 2009), w których osobno analizowano dsSDF i ssSDF (alkaliczny test kometowy), wykazały, że mężczyźni płodni mieli istotnie niższy odsetek plemników z dsSDF niż mężczyźni niepłodni (średnie: 6,60% vs. 33,60%), jednak nie różnili się odsetkiem plemników z ssSDF. Stąd też autorzy badań sugerują, że dsSDF mogą mieć większe znaczenie w etiopatogenezie męskiej niepłodności niż ssSDF. Ponadto podkreślają oni, że podwójne nacięcia nici DNA, w przeciwieństwie do pojedynczych nacięć, rzadziej podlegają efektywnej naprawie przez oocyty. Jednak nie zawsze wyniki testu kometowego korespondują ze statusem płodności mężczyzny. Nie stwierdzono bowiem różnic między grupą płodnych mężczyzn i grupą mężczyzn z niepłodnością idiopatyczną, gdy zastosowano alkaliczny test kometowy (Verit i wsp., 2006). Jednak ujawniono związek między wynikami testu kometowego a nawracającymi poronieniami (Ribas-Maynou i wsp., 2012b). Wykazano, że mężczyźni płodni mieli istotnie niższy odsetek plemników z pofragmentowanym DNA od mężczyzn z par, u których potwierdzono idiopatyczne nawracające poronienie niezależnie od zastosowanego wariantu metody. Istniała jednak duża różnica w średnich odsetkach plemników z uszkodzonym DNA w zależności od wariantu metody. W przypadku zastosowania neutralnego testu kometowego stwierdzono wyższe odsetki plemników z uszkodzonym DNA zarówno w grupie mężczyzn płodnych, jak i mężczyzn z par z historią poronień (średnie: 44,00% vs. 84,64%) w porównaniu z wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem alkalicznego testu kometowego (średnie: 23,53% vs. 33,61%). Ponadto wartość predykcyjna testu kometowego zależała od wariantu tego testu. W przypadku alkalicznego wariantu osiągnięto dobrą (AUC = 0,899) i bardzo dobrą (AUC = 0,977) wartość prognostyczną dla odróżnienia mężczyzn płodnych od niepłodnych (Javed i wsp., 2019; Ribas-Maynou i wsp., 2012b). Wartość graniczną stanowiło 45,65% lub 48,47% plemników z fragmentacją DNA. Jednakże nie potwierdzono istotnej wartości prognostycznej tego testu dla

² Odsetek plemników z uszkodzonym DNA zawierał zarówno odsetek komórek z pojedynczymi, jak i podwójnymi nacięciami DNA.

odróżnienia mężczyzn z par, u których wystąpiły nawracające poronienia od mężczyzn płodnych. Natomiast stosując neutralny test kometowy, wykazano dobrą wartość prognostyczną testu (AUC = 0,858) dla odróżnienia tych grup mężczyzn. Wartością graniczną było 77,50% plemników z pofragmentowanym DNA. Jednakże w badaniach tych nie wykazano wartości prognostycznej tego wariantu metody dla osiągnięcia ciąży (Ribas-Maynou i wsp., 2012b).

Testy z wykorzystaniem oranżu akrydyny

Do oceny integralności DNA wykorzystuje się również metachromatyczny fluorochrom oranżu akrydyny (OA, ang. *acridine orange*), który po uprzedniej denaturacji chromatyny za pomocą niskiego pH wiąże się z jądrowym DNA plemników. Gamety zawierające pojedynczą nić DNA emitują czerwoną fluorescencję w obrębie główki (komórki OA-pozytywne czerwone), z kolei te z podwójną nicią DNA zieloną (komórki OA-pozytywne zielone, prawidłowe). Jednakże ocena odsetka plemników barwionych OA w mikroskopie fluorescencyjnym nie ma statusu testu diagnostycznego (Agarwal i wsp., 2016; Kazerooni i wsp., 2009; Majzoub i wsp., 2020; Schulte i wsp., 2010; Sharma i wsp., 2020). Natomiast weryfikacja przeprowadzona w cytometrze przepływowym – test SCSA (ang. *sperm chromatin structure assay*) – jest wystandaryzowaną metodą diagnostyczną, w której ustala się indeks fragmentacji DNA (DFI, ang. *DNA fragmentation index*) oraz odsetek niedojrzałych plemników z dużą zawartością histonów, które silnie wiążą OA (HDS, ang. *high DNA stainability*) (Agarwal i wsp., 2016; Evenson, 2018; Majzoub i wsp., 2020; Schulte i wsp., 2010; Sharma i wsp., 2020).

Badania z wykorzystaniem OA i mikroskopii fluorescencyjnej wykazały, że mężczyźni płodni i zdrowi ochotnicy z normozoospermia mają istotnie niższy odsetek plemników OA-pozytywnych (czerwonych) (np. średnie: 11,50%, 17,12%, 17,30%) niż mężczyźni nieplodni (średnie: 31,06 i 33,50%), z żylakami powrózka nasiennego (średnia: 60,55%), z urazami rdzenia kręgowego (średnia: 62,66%), z częściową (średnia: 33,20%) lub całkowitą globozoospermia (średnia: 30,10%) (Ajina i wsp., 2017; Talebi i wsp., 2008, 2013, 2018). Jednakże część autorów nie wykazała różnic, w odsetku plemników OA-pozytywnych czerwonych, między grupą mężczyzn płodnych i nieplodnych (Chohan i wsp., 2006), jak również między grupą mężczyzn z par, u których stwierdzono nawracające poronienia (Kazerooni i wsp., 2009).

Podobnie w przypadku testu SCSA wykazano, że mężczyźni płodni mają istotnie niższy DFI (np. średnie: 8,90, 11,10%, 11,80%, mediana: 25,65%) niż mężczyźni nieplodni (np. średnie: 20,30%, 22,00%, 23,10%), z nieplodnością idiopatyczną (mediana: 34,28%) lub częściową globozoospermia (średnia: 33,83%) (Chohan i wsp., 2006; Hosseinifar i wsp., 2015; Saleh i wsp., 2003; Venkatesh i wsp., 2011; Zini i wsp., 2001, 2002). Jednak wyniki badań autorów nie zawsze są zgodne. Stwierdza się także brak różnic między grupą mężczyzn płodnych i nieplodnych,

ale z normozoospermia (Zini i wsp., 2002). Wykazuje się również, że mężczyźni płodni oraz nieplodni z normozoospermia mają istotnie niższy odsetek HSD niż mężczyźni nieplodni z nieprawidłowymi standardowymi parametrami seminologicznymi (odpowiednio mediany: 8,00% i 9,00% vs. 11,00%) (Saleh i wsp., 2003).

Podobnie jak w przypadku opisywanych już wcześniej metod, dokonano analizy krzywej ROC w celu określenia wartości predykcyjnej testu SCSA. Analiza ta wykazała, że test ten ma nie tylko satysfakcjonującą (AUC = 0,790), ale również bardzo dobrą (AUC = 0,919) wartość predykcyjną dla odróżnienia mężczyzn płodnych od nieplodnych. Wartość graniczna DFI dla poszczególnych AUC, powyżej której istnieje ryzyko nieplodności, wynosiła odpowiednio 20,08% i 30,28% (Javed i wsp., 2019; Venkatesh i wsp., 2011). Dane te zgodne są z wynikami innych autorów, którzy wskazują, że DFI ≤ 20% wiąże się z wysoką szansą na uzyskanie ciąży spontanicznej oraz po zastosowaniu inseminacji domacicznej, natomiast przy >20–30% szansa ta zdecydowanie się zmniejsza. Z kolei w przypadku DFI >30% sugeruje się wykorzystanie procedury zapłodnienia pozaustrojowego. Nie można pominąć faktu, że DFI >40% istotnie zwiększa ryzyko na wystąpienia poronień (Cho i wsp., 2017; Evenson, 2017).

Test TUNEL

Metoda TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) jest metodą bezpośrednio weryfikującą nacięcia DNA. Dzięki egzogennej terminalnej transferazie deoksynukleotydów (TdT, ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*) do wolnych końców 3'-OH pojedynczych i podwójnych nacięć nici DNA przyłączane są deoksynukleotydy (dNTP, ang. *deoxynucleotides*). Nacięcia DNA znakowane są fluoresceiną. Weryfikacja odsetka plemników z pofragmentowanym DNA (komórki TUNEL-pozytywne emitujące zieloną fluorescencję) przeprowadzana jest przeważnie w cytometrze przepływowym, ale można jej dokonać również przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Niezależnie od wykorzystanej aparatury badawczej metoda TUNEL nie ma statusu testu diagnostycznego (Agarwal i wsp., 2016; Muratori i Baldi, 2018; Schulte i wsp., 2010; Simon i wsp., 2017).

Jak wykazało wielu autorów, odsetek plemników TUNEL-pozytywnych u mężczyzn płodnych lub zdrowych ochotników z normozoospermia (np. średnie: 5,90%, 7,75%, 9,03%) jest istotnie niższy niż u mężczyzn nieplodnych (np. średnie: 18,84%, 32,91%, 40,90%), z urazami rdzenia kręgowego (średnia: 32,91%) oraz z częściową lub całkowitą globozoospermia (odpowiednio średnie: 12,30% i 18,30%) (Chohan i wsp., 2006; Darmishonnejad i wsp., 2020; Sergerie i wsp., 2005; Sharma i wsp., 2010; Talebi i wsp., 2013, 2018; Zhang i wsp., 2010). Ponadto ustalono, że mężczyźni z par, u których stwierdzono nawracające poronienia, mieli istotnie wyższy odsetek plemników TUNEL-pozytywnych niż mężczyźni płodni (średnie: 30,05% vs. 9,03%) (Talebi i wsp., 2016). Test TUNEL wydaje się również użytecznym

narzędziem umożliwiającym odróżnienie męczyzn płodnych od niepłodnych. Wykazano bowiem, że ma on dobrą (AUC = 0,820) lub bardzo dobrą (AUC = 0,901, 0,930) wartość predykcyjną. Stwierdzana wartość graniczna odsetka plemników TUNEL-pozytywnych, dla poszczególnych AUC wynosiła odpowiednio 19,25%, 22,08% i 20,00% (*Javed i wsp.*, 2019; *Sergerie i wsp.*, 2005; *Sharma i wsp.*, 2010).

Podsumowanie

Wyniki opisanych badań naukowych wyraźnie wskazują, że uszkodzenia chromatyny plemników są jednym z kluczowym czynników determinujących męską płodność, który może wpływać na sukces reprodukcyjny. Nieprawidłowości te mogą całkowicie uniemożliwiać zapłodnienie bądź też mogą być tolerowane na wczesnych etapach rozwoju prenatalnego, zwiększając jednak ryzyko utraty ciąży. Można zatem uznać, że ocena chromatyny plemników dostarcza cennych informacji o ich kompetencji do zapłodnienia, prawidłowego rozwoju zarodka i przebiegu ciąży. Analizy te powinny być rozważane wspólnie z wynikami standardowej oceny semilogicznej.

Finansowanie

Badania statutowe Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie nr: WNoZ-322-01/S/19/2020

Piśmiennictwo

- Adewoyin M., Ibrahim M., Roszaman R., Md Isa M.L., Alewi N.A.M., Rafa A.A. i wsp.: Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytocompounds on Seminal Oxidative Stress. *Diseases*. 2017, 5 (1), 9. DOI: 10.3390/diseases5010009. PMID: 28933362.
- 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 (6), 935–950. DOI: 10.21037/tau.2016.10.03. PMID: 28078226.
- Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R.: A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015, 13, 37. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1. PMID: 25928197.
- Agarwal A., Parekh N., Panner Selvam M.K., Henkel R., Shah R., Homa S.T. i wsp.: Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health*. 2019, 37 (3), 296–312. DOI: 10.5534/wjmh.190055 PMID: 31081299.
- Agarwal A., Sengupta P.: Oxidative Stress and Its Association with Male Infertility. W: *Male Infertility*. Red. Parekattil S., Esteves S., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2020, 57–68. DOI: 10.1007/978-3-030-32300-4_6.
- Aitken R.J.: Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*. 2020, 159 (4), 189–201. DOI: 10.1530/REP-19-0452. PMID: 31846434.
- Aitken R.J., Baker M.A.: Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol*. 2013, 57 (2-4), 265–272. DOI: 10.1387/ijdb.130146ja. PMID: 23784837.
- Aitken R.J., Baker M.A., Nixon B.: Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl*. 2015, 17 (4), 633–639. DOI: 10.4103/1008-682X.153850. PMID: 25999358.
- Aitken R.J., Drevet J.R.: The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants* (Basel). 2020, 9 (2), 111. DOI: 10.3390/antiox9020111. PMID: 32012712.
- Ajina T., Ammar O., Haouas Z., Sallem A., Ezzi L., Grissa I. i wsp.: Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. *Andrologia*. 2017, 49 (10). DOI: 10.1111/and.12765. PMID: 28224638.
- Ammar O., Mehdi M., Tekeya O., Neffati F., Haouas Z.: Novel association between apoptotic sperm biomarkers with seminal biochemical parameters and acetylcholinesterase activity in patients with teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2019, 36 (11), 2367–2378. DOI: 10.1111/and.12765:10.1007/s10815-019-01579-7. PMID: 31512048.
- Bianchi P.G., Manicardi G.C., Bizzaro D., Bianchi U., Sakkas D.: Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod*. 1993, 49 (5), 1083–1088. DOI: 10.1111/and.12765: 10.1095/biolreprod49.5.1083. PMID: 8286574.
- Björndahl L., Kvist U.: Structure of Chromatin in Spermatozoa. W: *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Red. Baldi E., Muratori M. Springer, New York, USA, 2014, 1–11. DOI: 10.1111/and.12765: 10.1007/978-1-4614-7783-9_1.
- Bui A.D., Sharma R., Henkel R., Agarwal A.: Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia*. 2018, 50 (8), e13012. DOI: 10.1111/and.12765:10.1111/and.13012. PMID: 29644708.
- Chanduszko-Salska J.: Znaczenie pomocy psychologicznej i psychoterapii we wspomaganiu leczenia niepłodności partnerskiej. *Post Androl*. 2016, 3 (1), 22–32.
- Cho C-L., Agarwal A.: Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab. J. Urol*. 2018, 16 (1), 21–34. DOI: 10.1111/and.12765:10.1016/j.aju.2017.11.002. PMID: 29713533.
- Cho C.L., Agarwal A., Majzoub A., Esteves S.C.: A single cut-off value of sperm DNA fragmentation testing does not fit all. *Transl Androl Urol*. 2017 (4), 501–503. DOI: 10.21037/tau.2017.08.12. PMID: 29082949.
- Chohan K.R., Griffin J.T., Lafromboise M., De Jonge C.J., Carrell D.T.: Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006, 27 (1), 53–59. DOI: 10.2164/jandrol.05068. PMID: 16400078.
- Choucair F.B., Rachkida E.G., Raada G.C., Salibaa E.M., Zeidanb N.S., Jounblata R.A. i wsp.: High level of DNA fragmentation in sperm of Lebanese infertile men using Sperm Chromatin Dispersion test. *Middle East Fertil Society Journal*. 2016, 21, 269–276. DOI: 10.1016/j.mefs.2016.06.005.
- Cortés-Gutiérrez E.I., Dávila-Rodríguez M.I., Fernández J.L., López-Fernández C., Aragón-Tovar A.R., Urbina-Bernal L.C. i wsp.: DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele evaluated by sperm chromatin dispersion and DBD-FISH. *Arch Gynecol Obstet*. 2016, 293 (1), 189–196. DOI: 10.1007/s00404-015-3822-y. PMID: 26223186.
- Cortés-Gutiérrez E.I., Dávila-Rodríguez M.I., López-Fernández C.: The Comet Assay. W: *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Red. Zini A., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2018, 119–135. DOI: 10.1007/978-3-319-71815-6_7.
- Darmishonnejad Z., Zarei-Kheirabadi F., Tavalae M., Zarei-Kheirabadi M., Zohrabi D., Nasr-Esfahani M.H.: Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men. *Andrologia*. 2020, 52 (5), e13546. DOI: 10.1111/and.13546. PMID: 32189393.
- 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 (3), 610–617. DOI: 10.1111/andr.12743. PMID: 31828966.
- Enciso M., Sarasa J., Agarwal A., Fernández J.L., Gosálvez J.: A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009, 18 (5), 609–616. DOI: 10.1016/s1472-6483 (10)60003-x. PMID: 19549437.
- Erenpreiss J., Zubkova K.: Cytochemical Tests of Sperm Chromatin Maturity W: *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Red.

- Zini A., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2018, 153–162. DOI: 10.1007/978-3-319-71815-6_9.
- 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 (4), 495–S500. DOI: 10.21037/tau.2017.07.20. PMID: 29082168. PMCID: PMC5643675.
- Evenson D.P.: Flow cytometric analysis of male germ cell quality. *Methods Cell Biol*. 1990, 33, 401–410. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)60543-9. PMID: 1707492.
- Evenson D.P.: Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®): Evolution from Origin to Clinical Utility. W: *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Red. Zini A., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2018, 65–90. DOI: 10.1007/978-3-319-71815-6_4.
- Evgeni E., Lymberopoulos G., Gazouli M., Asimakopoulos B.: Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015, 188, 17–23. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2015.02.026. PMID: 25770843.
- Fernández J.L., Johnston S., Gosálvez J.: Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Assay. W: *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Red. Zini A., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2018, 137–152. DOI: 10.1007/978-3-319-71815-6_8.
- Fernández J.L., Muriel L., Goyanes V., Segrelles E., Gosálvez J., Enciso M. *i wsp.*: Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005, 84 (4), 833–842. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089. PMID: 16213830.
- Gallegos G., Ramos B., Santiso R., Goyanes V., Gosálvez J., Fernández J.L.: Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril*. 2008, 90 (2), 328–334. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.035. PMID: 17953955.
- Gill K., Jakubik J., Rosiak-Gill A., Kups M., Lukaszuk M., Kurpisz M. *i wsp.*: Utility and Predictive Value of Human Standard Semen Parameters and Sperm DNA Dispersion for Fertility Potential. *Int J Environ Res Public Health*. 2019a, 16 (11), 2004. DOI: 10.3390/ijerph16112004. PMID: 31195656.
- Gill K., Rosiak-Gill A., Jakubik J., Patorski L., Lukaszuk M., Piasecka M.: The higher risk for sperm DNA damage in infertile men. *Ginek Pol*. 2019b, 90 (12), 684–691. DOI: 10.5603/GP.2019.0117. PMID: 31909460.
- Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z.: Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*. 1993, 207 (1), 202–205. DOI: 10.1006/excr.1993.1182. PMID: 8391465.
- Grunewald S., Paasch U., Said T.M., Sharma R.K., Glander H.J., Agarwal A.: Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril*. 2005, 83 (1), 1106–1112. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.12.011. PMID: 15831282.
- Hao S.L., Ni F.D., Yang W.X.: The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*. 2019, 706, 201–210. DOI: 10.1016/j.gene.2019.05.027. PMID: 31085275.
- Henkel R., Leisegang K.: Origins of Sperm DNA Damage. W: *Male Infertility*. Red. Parekattil S., Esteves S., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2020, 361–376. DOI: 10.1007/978-3-030-32300-4_29
- Henkel R., Solomon M.: Oxidative Stress. W: *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Red. Zini A., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2018, 179–195. DOI: 10.1007/978-3-319-71815-6_11.
- Hosseiniifar H., Yazdanikah S., Modarresi T., Totonchi M., Sadighi Gilani M.A., Sabbaghian M.: Correlation between sperm DNA fragmentation index and CMA3 positive spermatozoa in globozoospermic patients. *Andrology*. 2015, 3 (3), 526–531. DOI: 10.1111/andr.12030. PMID: 25865619.
- Idelchik M.D., Begley U., Begley T.J., Melendez J.A.: Mitochondrial ROS control of cancer. *Semin Cancer Biol*. 2017, 47, 57–66. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.04.005. PMID: 28445781.
- Inhorn M.C., Patrizio P.: Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*. 2015, 21 (4), 411–426. DOI: 10.1093/humupd/dmv016. PMID: 25801630.
- Jakubik-Uljasz J., Gill K., Rosiak-Gill A., Piasecka M.: Relationship between sperm morphology and sperm DNA dispersion. *Transl Androl Urol*. 2020, 9 (2), 405–415. DOI: 10.21037/tau.2020.01.31. PMID: 32420146.
- Javed A., Talkad M.S., Ramaiah M.K.: Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med*. 2019, 46 (1), 14–21. DOI: 10.5653/term.2019.46.1.14. PMID: 30827073.
- 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 (11-12), 591–596. DOI: 10.1007/s10815-009-9361-3. PMID: 19894107.
- Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A., Meriano J., Casper R.F.: Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1998, 69 (3), 528–532. DOI: 10.1016/s0015-0282(97)00536-0. PMID: 9531891.
- Machen G.L., Sandlow J.I.: Causes of Male Infertility. W: *Male Infertility*. Red. Parekattil S., Esteves S., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2020, 3–14. DOI: 10.1007/978-3-030-32300-4_1.
- Majzoub A., Agarwal A., Cho C-L., Esteves S.C.: Best Practice Guidelines for Sperm DNA Fragmentation Testing. W: *Male Infertility*. Red. Parekattil S., Esteves S., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2020, 793–804. DOI: 10.1007/978-3-030-32300-4_63.
- Majzoub A., Arafa M., Mahdi M., Agarwal A., Al Said S., Al-Emadi I. *i wsp.*: Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab J Urol*. 2018, 16 (1), 87–95. doi:10.1016/j.aju.2017.11.014. PMID: 29713539.
- Manicardi G.C., Bianchi P.G., Pantano S., Azzoni P., Bizzaro D., Bianchi U. *i wsp.*: Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*. 1995, 52 (4), 864–867. DOI: 10.1095/biolreprod52.4.864. PMID: 7540051.
- McPherson S.M., Longo F.J.: Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev*. 1992, 31, 268–79. DOI: 10.1002/mrd.1080310408. PMID: 1315143.
- Muratori M., Baldi E.: TUNEL Assay. W: *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Red. Zini A., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2018, 91–102. DOI: 10.1007/978-3-319-71815-6_5.
- Muratori M., Marchiani S., Maggi M., Forti G., Baldi E.: Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci*. 2006, 11, 1491–1499. DOI: 10.2741/1898. PMID: 16368531.
- Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Baldi E.: Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. W: *Genetic Damage in Human Spermatozoa, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Red. Baldi E., Muratori M. Springer Cham, Switzerland, 2019, 75–86. DOI: 10.1007/978-3-030-21664-1_5.
- Murshidi M.M., Choy J.T., Eisenberg M.L.: Male Infertility and Somatic Health. *Urol Clin North Am*. 2020, 47 (2), 211–217. DOI: 10.1016/j.ucl.2019.12.008. PMID: 32272993.
- Nasr-Esfahani M.H., Aboutorabi R., Razavi S.: Credibility of Chromomycin A3 Staining in Prediction of Fertility. *Intern J of Fertile and Steril*. 2009, 3 (1), 5–10.
- Nili H.A., Mozdarani H., Aleyasin A.: Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod Biomed Online*. 2009, 18 (4), 479–485. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60123-x. PMID: 19400988.
- Pan M.M., Hockenberry M.S., Kirby E.W., Lipshultz L.I.: Male Infertility Diagnosis and Treatment in the Era of In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Med Clin North Am*. 2018, 102 (2), 337–47. DOI: 10.1016/j.mcna.2017.10.008. PMID: 29406062.
- Panner Selvam M.K., Ambar R.F., Agarwal A., Henkel R.: Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia*. 2020, e13706. DOI: 10.1111/and.13706. PMID: 32559347.
- Patankar A., Parte P.: Sperm Chromatin Compaction and Male Infertility. W: *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment*. Red. Singh R., Singh K. Springer, Singapore, 2017, 295–315. DOI: 10.1007/978-981-10-4017-7_17.
- Pourmasumi S., Khoradmehr A., Rahiminia T., Sabeti P., Talebi A.R., Ghasemzadeh J.: Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *J Reprod Infertil*. 2019, 20 (2), 95–101. PMID: 31058054.

- Ribas-Maynou J., Benet J.: Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. *Genes* (Basel). 2019, 10 (2), 105. DOI: 10.3390/genes10020105. PMID: 30708937.
- Ribas-Maynou J., García-Peiró A., Abad C., Amengual M.J., Navarro J., Benet J.: Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod*. 2012a, 27 (3), 652–658. DOI: 10.1093/humrep/der461. PMID: 22252081.
- Ribas-Maynou J., García-Peiró A., Fernandez-Encinas A., Amengual M.J., Prada E., Cortés P. i wsp.: Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One*. 2012b, 7 (9), e44679. DOI: 10.1371/journal.pone.0044679. PMID: 23028579.
- Rosiak-Gill A., Gill K., Jakubik J., Fraczek M., Patorski L., Gaczarzewicz D. i wsp.: Age-related changes in human sperm DNA integrity. *Aging* (Albany NY). 2019, 11 (15), 5399–5411. DOI: 10.18632/aging.102120. PMID: 31412318.
- Sakkas D., El-Fakahany H.M.: Apoptosis in Ejaculated Spermatozoa and in the Normal and Pathological Testes: Abortive Apoptosis and Sperm Chromatin Damage. W: *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Red. Zini A., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2018, 197–218. DOI: 10.1007/978-3-319-71815-6_12.
- Sakkas D., Seli E., Bizzaro D., Tarozzi N., Manicardi G.C.: Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2003, 7 (4), 428–432. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61886-x. PMID: 14656403.
- Saleh R.A., Agarwal A., Nada E.A., El-Tonsy M.H., Sharma R.K., Meyer A. i wsp.: Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003, 79 (3), 1597–1605. DOI: 10.1016/s0015-0282(03)00337-6. PMID: 12801566.
- Schulte R.T., Ohl D.A., Sigman M., Smith G.D.: Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2010, 27 (1), 3–12. DOI: 10.1007/s10815-009-9359-x. PMID: 20012685.
- Sergerie M., Laforest G., Bujan L., Bissonnette F., Bleau G.: Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005, 20 (12), 3446–3451. DOI: 10.1093/humrep/dei231. PMID: 16085665.
- Sharma R., Martinez M.P., Agarwal A.: Sperm Chromatin Integrity Tests and Indications. W: *Male Infertility*. Red. Parekattil S., Esteves S., Agarwal A. Springer, Cham, Switzerland, 2020, 99–122. DOI: 10.1007/978-3-030-32300-4_8.
- Sharma R.K., Sabanegh E., Mahfouz R., Gupta S., Thiyagarajan A., Agarwal A.: TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology*. 2010, 76 (6), 1380–1386. DOI: 10.1016/j.urology.2010.04.036. PMID: 20573380.
- Sheikh N., Amiri I., Farimani M., Najafi R., Hadeie J.: Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Iran J Reprod Med*. 2008, 6 (1), 13–18.
- Simon L., Emery B.R., Carrell D.T.: Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017, 44, 38–56. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.07.003. PMID: 28935366.
- Szkodziak F., Krzyżanowski J., Szkodziak P.: Psychological aspects of infertility. A systematic review. *J Int Med Res*. 2020, 48 (6), 300060520932403. DOI: 10.1177/0300060520932403. PMID: 32600086.
- Talebi A.R., 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. *Int J Reprod Biomed*. 2016, 14 (3), 199–204. PMID: 27294219.
- Talebi A.R., Ghasemzadeh J., Khalili M.A., Halvaei I., Fesahat F.: Sperm chromatin quality and DNA integrity in partial versus total globozoospermia. *Andrologia*. 2018, 50 (1). DOI: 10.1111/and.12823. PMID: 28517043.
- Talebi A.R., Khalili M.A., Vahidi S., Ghasemzadeh J., Tabibnejad N.: Sperm chromatin condensation, DNA integrity, and apoptosis in men with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2013, 36 (2), 140–146. DOI: 10.1179/2045772312Y.0000000055. PMID: 23809529.
- Talebi A.R., Moein M.R., Tabibnejad N., Ghasemzadeh J.: Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia*. 2008, 40 (4), 245–251. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2008.00852.x. PMID: 18727735.
- Talebi A.R., Vahidi S., Aflatoonian A., Ghasemi N., Ghasemzadeh J., Firoozabadi R.D. i wsp.: Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia*. 2012, 44 (1), 462–470. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01206.x. PMID: 21806662.
- Tsarev I., Bungum M., Giwercman A., Erenpreisa J., Ebbesen T., Ernst E. i wsp.: Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment. *Hum Reprod*. 2009, 24 (7), 1569–1574. DOI: 10.1093/humrep/dep068. PMID: 19304993.
- Uppangala S., Pudakalakatti S., D'souza F., Salian S.R., Kalthur G., Kumar P. i wsp.: Influence of sperm DNA damage on human preimplantation embryo metabolism. *Reprod Biol*. 2016, 16 (3), 234–241. DOI: 10.1016/j.repbio.2016.07.004. PMID: 27492188.
- 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. *Post Androl Online*. 2017, 4 (1), 6–21.
- Vander Borgh M., Wyns C.: Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018, 62, 2–10. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012. PMID: 29555319.
- Vatannejad A., Tavilani H., Sadeghi M.R., Karimi M., Lakpour N., Amanpour S. i wsp.: Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men. *J Endocrinol Invest*. 2019, 42 (10), 1181–1189. DOI: 10.1007/s40618-019-01035-4. PMID: 30963466.
- Venkatesh S., Singh A., Shamsi M.B., Thilagavathi J., Kumar R., Mitra D.K. i wsp.: Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. *Reprod Sci*. 2011, 18 (10), 1005–1013. DOI: 10.1177/1933719111401662. PMID: 21960513.
- Verit F.F., Verit A., Kocyigit A., Ciftci H., Celik H., Koksall M.: No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet*. 2006, 274 (6), 339–344. DOI: 10.1007/s00404-006-0172-9. PMID: 16912857.
- Ward S.W.: Sperm Chromatin Stability and Susceptibility to Damage in Relation to Its Structure. W: *The Sperm Cell*, Second Edition. De Jonge C.J., Barratt C.L. (red). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2017, 21–35. DOI: 10.1017/9781316411124.004.
- Wiweko B., Utami P.: Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility. *Basic Clin Androl*. 2017, 27, 1. DOI: 10.1186/s12610-016-0046-3. PMID: 28239474.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. World Health Organization Press, Geneva 2010.
- Zandemami M., Qujeq D., Akhondi M.M., Kamali K., Raygani M., Lakpour N. i wsp.: Correlation of CMA3 Staining with Sperm Quality and Protamine Deficiency. *Lab Medicine*. 2012, 43 (6), 262–267. DOI: 10.1309/LMB42F9QXYKFLJNG.
- Zhang L.H., Qiu Y., Wang K.H., Wang Q., Tao G., Wang L.G.: Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay. *Fertil Steril*. 2010, 94 (3), 1027–1032. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.034. PMID: 19505686.
- Zini A., Fischer M.A., Sharir S., Shayegan B., Phang D., Jarvi K.: Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology*. 2002, 60 (6), 1069–1072. DOI: 10.1016/s0090-4295(02)01975-1. PMID: 12475672.
- Zini A., Kamal K., Phang D., Willis J., Jarvi K.: Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*. 2001, 58 (2), 258–261. DOI: 10.1016/s0090-4295(01)01180-3. PMID: 11489713.