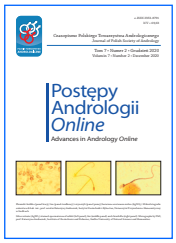
Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego

Postępy Andrologii *Online*

Advances in Andrology *Online*

http://www.postepyandrologii.pl



WPŁYW STATUSU CHROMATYNY PLEMNIKÓW LUDZKICH NA WYNIKI ROZRODU W WARUNKACH *IN VITRO*

THE INFLUENCE OF HUMAN SPERM CHROMATIN STATUS ON *IN VITRO* FERTILIZATION OUTCOME

Kamil Gill [1]*, Tomasz Machałowski [1,2], Klaudia Piasecka [1], Patryk Harasny [3], Małgorzata Piasecka [1]

[1]Zakład Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, [2]Klinika Perinatologii, Położnictwa i Ginekologii SPSK1, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, [3]Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej SPSK2, 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: 01.12.2020 r. Zaakceptowano/accepted: 21.12.2020 r.

DOI: 10.26404/PAO_2353-8791.2020.04

open access

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. Bokiniec 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

Poniższy artykuł jest kontynuacją poprzedniego (Post Androl Online, 2020, 7(1), 30–43) i zawiera zebrane dane dotyczące oceny wpływu jakości chromatyny plemników ludzkich na rezultaty procedury zapłodnienia *in vitro*. Przeanalizowano wyniki badań, w których wykorzystano powszechnie stosowane testy molekularne weryfikujące status chromatyny męskich komórek rozrodczych oraz przedyskutowano związek między tym statusem a procesem zapłodnienia, rozwojem zarodka, uzyskaniem ciąży, jej przebiegiem oraz ryzykiem

Artykuł jest udostępniany na podstawie Licencji Creative Commons BY NC ND 3.0 Polska:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.pl

poronienia i szansą na urodzenie żywego dziecka. Większość autorów uważa, że w wielu przypadkach wzrost stopnia uszkodzeń chromatyny męskich gamet niekorzystnie wpływa na każdy z ocenianych etapów rozwoju zarodka i przebieg ciąży. Jednak wyniki badań nie zawsze są jednoznaczne i oczywiste. Istnieją doniesienia, w których nieprawidłowości chromatyny plemnika niekoniecznie wpływają na wszystkie badane etapy rozwoju zarodka i przebieg ciąży. Ponadto niektórzy autorzy nie potwierdzają istnienia związku między statusem chromatyny plemników a sukcesem procedury zapłodnienia *in vitro*. Sugeruje się, że brak zgodności wyników uzyskanych przez autorów może być efektem wykorzystania przez nich różnych metod selekcji męskich gamet, odmiennych procedur zapłodnienia *in vitro* i testów oceny statusu chromatyny męskich komórek rozrodczych oraz odmiennych narzędzi statystycznych służących analizie uzyskanych danych. Należy także podkreślić, że badania prezentowane w piśmiennictwie wykonywane były na grupach, które wykazywały dużą heterogenność (odmienne liczebności grup, struktura wieku badanych i przyczyny niepłodności). Niemniej jednak w wielu najnowszych doniesieniach autorzy wskazują, że uszkodzenie chromatyny plemników jest istotnym determinantem sukcesu rozrodczego w warunkach zapłodnienia *in vitro* i w zależności od wartości tego parametru proponuje się różne scenariusze terapeutyczne.
Słowa kluczowe: chromatyna plemnika, zapłodnienie *in vitro*, rozwój zarodka, ciąża, poronienia

Abstract

The following article is a continuation of pervious one (Post Androl Online, 2020, 7(1), 30–43) and contains a compilation of scientific reports concerning the impact of human sperm chromatin quality on *in vitro* fertilization outcomes. In this paper, the results of commonly used molecular sperm chromatin were presented. Furthermore, the relationships between sperm chromatin maturity/integrity and the fertilization, embryo development, the chance of getting pregnant, risk of miscarriage and chance of live birth were widely discussed. Most authors reports that in many cases the increase in the level of sperm chromatin damage adversely affects embryo development and the course of pregnancy. However, the results are not always in line and obvious. There are scientific papers in which the abnormalities of the sperm chromatin do not necessarily affect all of the embryo development stages and the course of pregnancy. Moreover, some authors do not confirm the existence of a associations between the sperm chromatin status and the *in vitro* fertilization outcomes. It has been suggested that the inconsistency of the obtained data may result from: 1) different methods used for male gametes selection, 2) different *in vitro* fertilization procedures, 3) diverse sperm chromatin tests and 4) different statistical tools used to analyze the obtained data. Moreover, it should be highlighted that the findings presented in the scientific papers were carried out on the high heterogeneity groups (different subjects, age structure of enrolled individuals and causes of infertility). However, in many recent reports, the authors indicate that high sperm chromatin quality is an important determinant of reproductive success in *in vitro* conditions. According to the level of sperm chromatin abnormalities proper therapeutic scenario should be chosen.
Key words: sperm chromatin, *in vitro* fertilization, embryo development, pregnancy, miscarriage

Skróty / Abbreviations

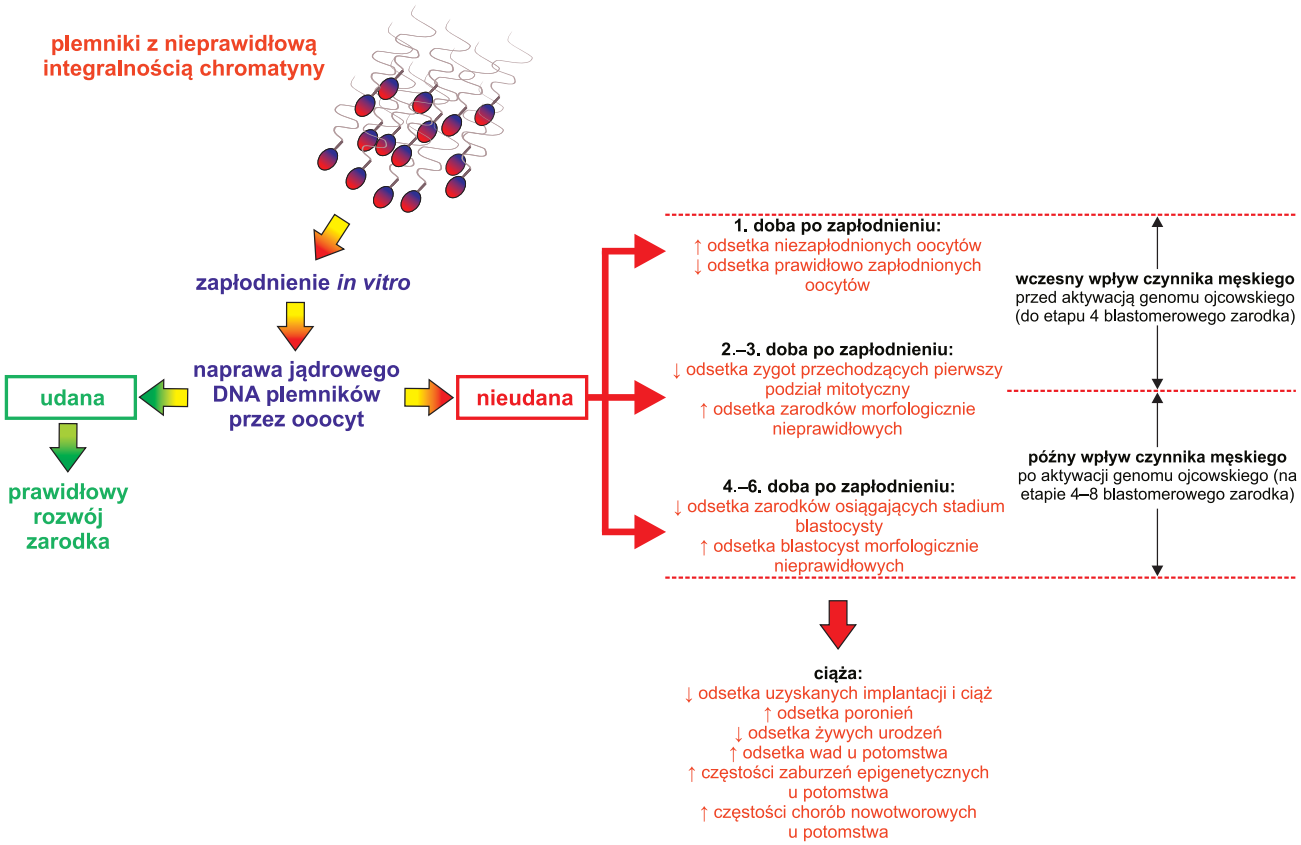
β-hCG – podjednostka β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (ang. *human chorionic gonadotropin β-subunit*); AB – błękit aniliny (ang. *anilin blue*); ART – techniki wspomaganego rozrodu (ang. *assisted reproductive technology*); CMA3 – chromomycyna A3 (ang. *chromomycin A3*); DFI – indeks fragmentacji DNA (ang. *DNA fragmentation index*); DGC – selekcja plemników z wykorzystaniem wirowania na gradiencie stężeń (ang. *density gradient centrifugation*); HDS – intensywne wiązanie oranżu akrydyny (ang. *high DNA stainability*); FR – odsetek zapłodnionych oocytów (ang. *fertilization rate*); ICM – węzeł zarodkowy (ang. *inner cell mass*); ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika (ang. *intracytoplasmic sperm injection*); IMSI-MSOME – zapłodnienie ISCI z wykorzystaniem plemników poddanych szczegółowej ocenie morfologicznej z wykorzystaniem 6000–13000-krotnego powiększenia (ang. *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection with motile sperm organelle morphology examination*); IUI – inseminacja domaciczna (ang. *intrauterine insemination*); MESA-ICSI – zapłodnienie *in vitro* z wykorzystaniem plemników pobranych aspiracyjnie z najądrza (ang. *microscopic epididymal sperm aspiration*); m-TESE-ICSI – zapłodnienie in vitro z wykorzystaniem plemników pobranych mikrochirurgicznie z jądra (ang. *microsurgical testicular sperm extraction*); OA – oranż akrydyny (ang. *acridine orange*); OR – iloraz szans (ang. *odds ratio*); SCD – test dyspersji chromatyny plemników (ang. *sperm chromatin dispersion test*); SCSA – ocean struktury chromatyny plemników (ang. *sperm chromatin structure assay*); TB – błękit toluidyny (ang. *toluidin blue*); TE – trofoektoderma (ang. *trophoblast*); TESA-ICSI – zapłodnienie *in vitro* z wykorzystaniem plemników pobranych aspiracyjnie z jądra (ang. *testicular sperm aspiration*); TUNEL – znakowanie końców nacięć nici DNA za pośrednictwem terminalnej transferazy deoksynukleotydowej (ang. *terzaminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*)

Na przestrzeni ostatnich kilku dekad ma miejsce intensywny rozwój technik wspomaganego rozrodu (ART, ang. *assisted reproductive technology*), głównie klasycznego zapłodnienia pozaustrojowego *in vitro* (IVF, ang. *in vitro fertilization*) i docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI, ang. *intracytoplasmic sperm injection*). W przypadku tej drugiej techniki w zależności od sposobu wyselekcjonowania męskich gamet lub ich pozyskiwania wyróżnia się: 1) zapłodnienie z wykorzystaniem plemników ruchliwych i morfologicznie prawidłowych (IMSI-MSOME, ang. *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection with motile sperm organelle morphology*

examination), 2) aspirowanych z najądrza (MESA-ICSI, ang. *microscopic epididymal sperm aspiration*), 3) aspirowanych z jądra (TESA-ICSI, ang. *testicular sperm aspiration*) i 4) uzyskanych poprzez biopsję jądra (m-TESE, ang. *microsurgical testicular sperm extraction*). Początkowo sądzono, że w przypadku zastosowania tych technik, które szczególnie omijają naturalne bariery, na jakie napotyka plemnik podczas fizjologicznego zapłodnienia, wnikliwa, zwłaszcza molekularna weryfikacja męskich komórek rozrodczych niekoniecznie musi mieć znaczenie kliniczne. Jednakże obserwowane nieuzasadnione czynnikiem żeńskim niepowodzenia w tych procedurach sprawiły, że ocena jakości męskich gamet ponownie stała się obiektem badań doświadczalnych i klinicznych mających na celu weryfikację wpływu czynnika męskiego na prognozowanie sukcesu reprodukcyjnego w warunkach *in vitro* (*Benagiano i wsp.*, 2017; *Kirkman-Brown* i *De Jonge*, 2017; *Piasecka i wsp.*, 2021; *Rogenhofer i wsp.*, 2017).

Warto również podkreślić, że zastosowanie nawet metody IMSI-MSOME, podczas której embriolog dokonuje zapłodnienia komórki jajowej jednym precyzyjnie wyselekcjonowanym plemnikiem, nie daje gwarancji wybrania gamety wolnej od wad substrukturalnych i molekularnych. Co więcej, ominięcie naturalnych barier, na jakie plemnik natrafia w trakcie spotkania się z komórką jajową, i uzyskanie zapłodnienia z wykorzystaniem uszkodzonego plemnika może stać się przyczyną nieprawidłowości obserwowanych podczas wczesnego rozwoju zarodka, przebiegu ciąży bądź też chorób u potomstwa, co niewątpliwie może wiązać się ze wzrostem ryzyka przeniesienia defektów genetycznych (rycina 1) (*Drenth Olivares i wsp.*, 2019; *Jauniaux i wsp.*, 2020; *Piasecka* i *Gill*, 2021; *Spector i wsp.*, 2019; *Taylor i wsp.*, 2014; *Ventura-Juncá i wsp.*, 2015). Dlatego też prognozowanie sukcesu rozrodczego i oszacowanie ryzyka genetycznego wymaga prowadzenia badań weryfikujących jakość męskich gamet na poziomie molekularnym w przypadku wykorzystania technik zapłodnienia pozaustrojowego (*Krausz i wsp.*, 2018; *Piasecka i wsp.*, 2021; *Watanabe*, 2018).

Status chromatyny plemników (budowa, kondensacja, integralność) to jeden z najistotniejszych biomarkerów



Ryc. 1. Schemat przedstawiający możliwe konsekwencje wynikające z wykorzystania do procedury zapłodnienia *in vitro* plemników z nieprawidłową integralnością chromatyny, której naprawa przekracza możliwości oocytu. Naprawa ta rozpoczyna się już na etapie przedjądrzy i może trwać do 5. doby rozwoju zarodka, czyli osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty. Preferencyjnie naprawiane są pojedyncze pęknięcia nici DNA. Wczesny wpływ czynnika męskiego może przejawiać się jeszcze przed aktywacją genomu ojcowskiego, co w konsekwencji może prowadzić do zaburzeń procesu zapłodnienia oraz wczesnych etapów podziałów blastomerów (do etapu 4 blastomerowego zarodka). Z kolei późny wpływ czynnika męskiego występuje po aktywacji genomu ojcowskiego (na etapie 4–8 blastomerowego zarodka) i może skutkować nieprawidłowym rozwojem zarodka w 3. dobie po zapłodnieniu oraz zaburzeniami rozwoju blastocysty. W konsekwencji można spodziewać się spadku liczby uzyskanych ciąż, zwiększenia liczby poronień i zmniejszenia liczby żywych urodzeń. Wskazuje się, że nieprawidłowości chromatyny plemników mogą zakłócać epigenetyczne przeprogramowanie genomu ojcowskiego, które ma miejsce podczas tworzenia przedjądra męskiego, co w efekcie może mieć znaczenie międzypokoleniowe. Ponadto sugeruje się, że nienaprawione uszkodzenia jądrowego DNA plemników mogą przyczynić się zaburzeń organogenezy i wzrostu ryzyka chorób nowotworowych u potomstwa (*Aitken*, 2017; *Drenth Olivares i wsp.*, 2019; *Halvaei i wsp.*, 2020; *Jauniaux i wsp.*, 2020; *Piasecka* i *Gill*, 2021; *Spector i wsp.*, 2019; *Taylor i wsp.*, 2014; *Ventura-Juncá i wsp.*, 2015)

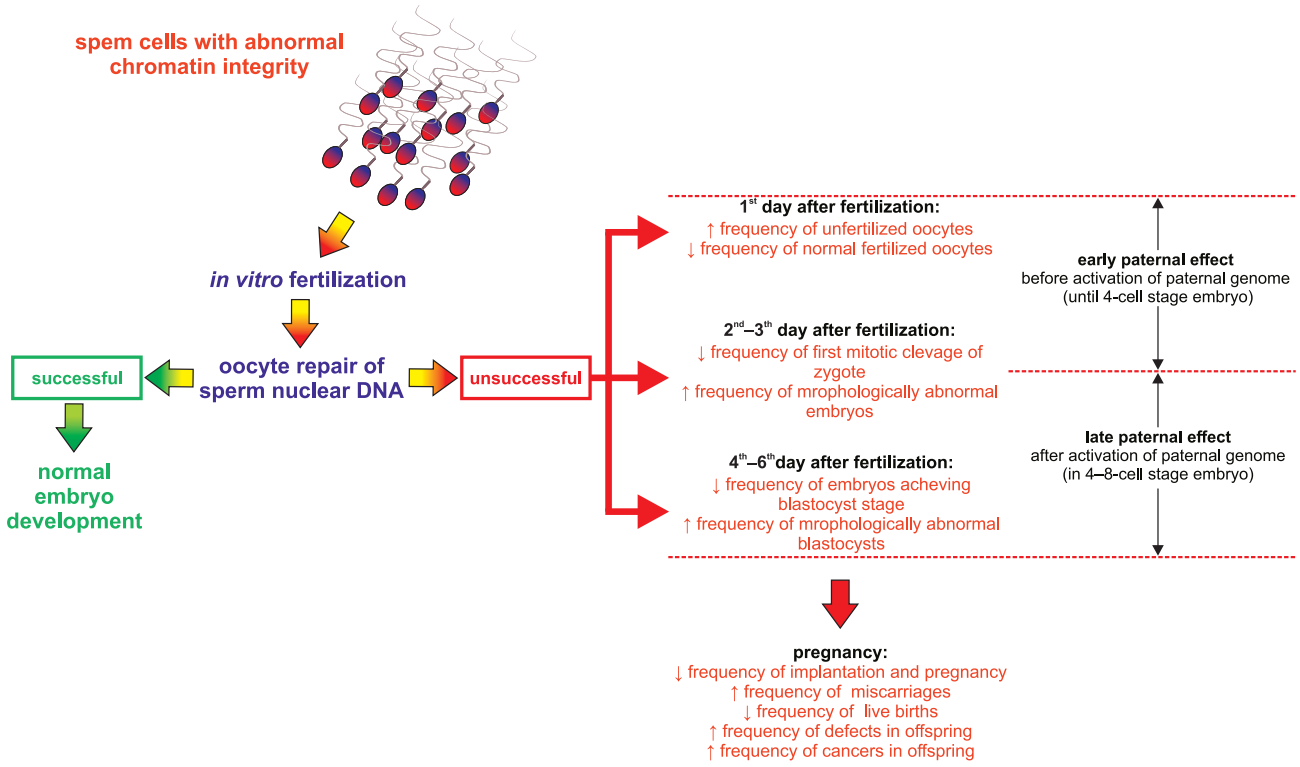
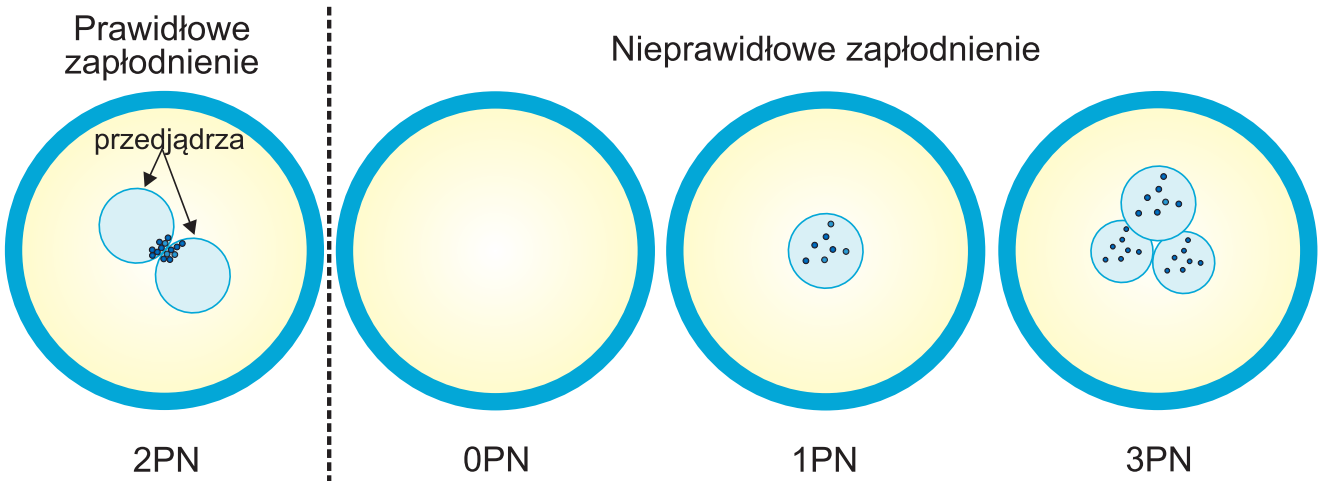


Fig. 1. Schema illustrating the possible consequences resulting from the using of the sperm cells with abnormal chromatin integrity in *in vitro* fertilization, the repair of which exceeds the ability of the oocyte. The repair starts at the pronuclei stage and can last up to 5th day of the embryo development, when the blastocyst stage is reached. The DNA single-strand breaks are preferentially repaired. Early paternal effect can manifest before the activation of the paternal genome, which in turn may lead to disturbances in the fertilization process and early embryo cleavage (up to the 4-cell embryo stage). On the other hand, late paternal effect occur after the activation of the paternal genome (at the 4–8-cell embryo stage) and may result in abnormal embryo development on the 3rd day after fertilization and abnormal blastocyst development. As a consequence, a decrease in the number of pregnancies obtained, an increase in the number of miscarriages and a decrease in the number of live births can be expected. It is suggested that sperm chromatin abnormalities can disturb epigenetic reprogramming of paternal genome during the male pronucleus formation which may have intergenerational effects. Furthermore, unrepaired sperm chromatin damages may contribute to abnormal organogenesis and an increase in frequency of cancers in offspring (*Aitken*, 2017; *Drenth Olivares et al.*, 2019; *Halvaei i wsp.*, 2020; *Jauniaux et al.*, 2020; *Piasecka* and *Gill*, 2021; *Spector et al.*, 2019; *Taylor et al.*, 2014; *Ventura-Juncá et al.*, 2015)

niepłodności męskiej, gdyż jak wskazuje wiele najnowszych doniesień, determinuje on proces zapłodnienia, rozwój zarodka i uzyskanie ciąży nie tylko w warunkach naturalnej koncepcji, ale również wspomaganej medycznie (*Agarwal i wsp.*, 2020; *Ambar i wsp.*, 2020; *Borges i wsp.*, 2019; *Chen i wsp.*, 2020; *Gill* i *Piasecka*, 2020; *Jerre i wsp.*, 2019; *Parrella i wsp.*, 2019; *Tang i wsp.*, 2020; *Zheng i wsp.*, 2018). Z drugiej strony, nie można pominąć faktu, że dane dotyczące wpływu jakości materiału genetycznego plemników na parametry embriologiczne i dalszy przebieg ciąży często są niejednoznaczne i nieoczywiste, a nawet pozostają ze sobą w sprzeczności. Wynikać to może z: 1) metod selekcji męskich gamet, 2) zastosowania różnych procedur zapłodnienia pozaustrojowego, 3) wykorzystania odmiennych metod oceny chromatyny męskich gamet, w których przyjmuje się różne (często empirycznie wyznaczane) wartości graniczne uznane za wynik prawidłowy tych testów i 4) heterogenności par objętych badaniami (odmienne liczebności grup, struktura wieku badanych i przyczyny niepłodności) (*Green i wsp.*, 2020; *Iranpour*, 2014; *Lopes i wsp.*, 1998; *Oleszczuk i wsp.*, 2016; *Pregl Breznik i wsp.*, 2013; *Velez de la Calle i wsp.*, 2008; *Wdowiak i wsp.*, 2015; *Xue i wsp.*, 2016). Dodatkową trudność w ocenie wpływu statusu chromatyny na wyniki procedury zapłodnienia *in vitro* stanowi zdolność oocytu do naprawy plemnikowego DNA (rycina 1). Ponadto w przypadku technik wykorzystujących zapłodnienie *in vitro* zarodki transferowane do macicy podlegają selekcji przeprowadzanej przez embriologa, co również może utrudnić ocenę wpływu jakości chromatyny męskich gamet na przebieg ciąży (*Fishel i wsp.*, 2020; *Gill i wsp.*, 2018; *Piasecka* i *Gill*, 2021; *Sigalos i wsp.*, 2016).

Do weryfikacji dojrzałości chromatyny plemników stosuje się m.in. test z błękitem aniliny (AB, ang. *aniline blue*), chromomycyną A3 (CMA3, ang. *chromomycin A3*), błękitem toluidyny (TB, ang. *toluidine blue*), które odpowiednio identyfikują nadmiar resztkowych histonów, stopień protaminacji i nieprawidłowości kondensacji chromatyny. Natomiast w ocenie integralności jądrowego DNA plemników mają zastosowanie wystandaryzowane testy diagnostyczne, takie jak test dyspersji chromatyny plemników (SCD, ang. *sperm chromatin dispersion*) umożliwiający określenie odsetka plemników z pofragmentowanym DNA (SDF, ang. *sperm DNA fragmentation*) oraz test SCSA (ang. *sperm chromatin structure assay*) z wykorzystaniem oranżu akrydyny (OA, ang. *acridine orange*) umożliwiający określenie indeksu fragmentacji



Ryc. 2. Schemat ilustrujący kryteria oceny procesu zapłodnienia *in vitro*, przeprowadzanej w 1. dobie po zapłodnieniu. 0PN – brak widocznych przedjądrzy, 1PN – widoczne tylko jedno przedjądrze, 2PN – widoczne dwa przedjądrza, 3PN – widoczne trzy przedjądrza. Opracowane na podstawie *Bączkowski i wsp.* (2004) oraz *ESHRE* (2017)

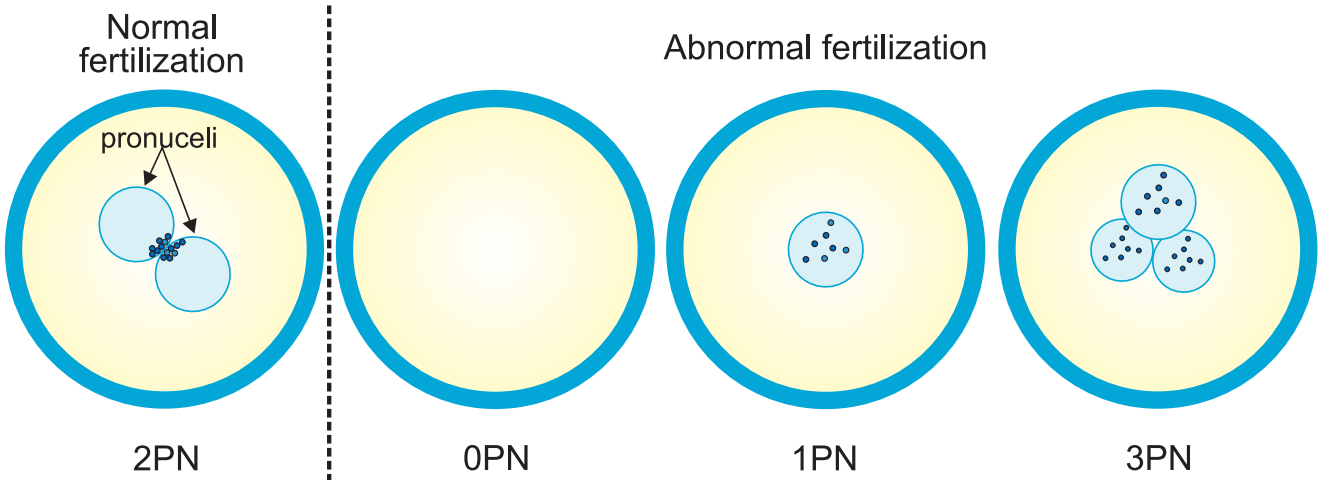


Fig. 2. Schema illustrating the criteria of fertilization in *in vitro* conditions in 1st day after fertilization. 0PN – no visible pronuclei, 1PN – only one visible pronucleus, 2PN – two visible pronuclei, 3PN – three visible pronuclei. Based on *Bączkowski et al.* (2004) and *ESHRE* (2017)

DNA plemników (DFI, ang. *DNA fragmentation index*) oraz odsetka plemników z dużą zawartością histonów jądrowych intensywnie wiążących OA (HDS, ang. *high DNA stainability*). Inne testy to test kometowy (ang. *comet assay*) i TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) (*Gill* i *Piasecka*, 2020; *Marchlewska i wsp.*, 2021).

Wpływ statusu chromatyny plemników na proces zapłodnienia

Potwierdzeniem uzyskania prawidłowego zapłodnienia jest obecność dwóch ciałek kierunkowych oraz dwóch przedjądrzy – żeńskiego i męskiego, które powinny być zbliżonej wielkości, zlokalizowane blisko siebie w centralnej części oocytu. Zgodnie z rekomendacjami II konsensusu wiedeńskiego (*ESHRE*, 2017) weryfikacja zarodka powinna odbywać się 17 h ±1 h po zapłodnieniu. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku metody ICSI wytworzenie przedjądrzy może mieć miejsce 1,5–2 h wcześniej niż w przypadku klasycznego IVF. Natomiast brak widocznych w 1. dobie przedjądrzy lub obecność tylko jednego przedjądrza bądź trzech przedjądrzy uznaje się za cechy nieprawidłowego zapłodnienia (rycina 2) (*Bączkowski i wsp.*, 2004; *ESHRE*, 2017; *Gill i wsp.*, 2018; *Nasiri* i *Eftekhari-Yazdi*, 2015; *Tang i wsp.*, 2020; *Wdowiak i wsp.*, 2015).

Wraz ze wzrostem odsetka plemników z obniżonym statusem chromatyny rośnie ryzyko niepowodzeń w uzyskaniu zapłodnienia

Istnienie zależności między jakością materiału genetycznego męskich komórek rozrodczych a procesem zapłodnienia potwierdzają prace licznych autorów. Wykazują

oni istotnie niższy odsetek prawidłowo zapłodnionych oocytów w stosunku do wszystkich zapładnianych oocytów (FR, ang. *fertilization rate*) w przypadku niepłodnych par, w których partnerami byli mężczyźni z:

- ≥10% plemników TUNEL-pozytywnych vs. <10% (metoda IVF i ICSI) (*Benchaib i wsp.*, 2003),
- >17,60% plemników TUNEL-pozytywnych vs. ≤17,60% (metoda ICSI) (*Avendaño i wsp.*, 2010),
- >20% plemników AB-pozytywnych vs. ≤20% (metoda IVF) (*Hammadeh i wsp.*, 1998),
- ≥30% plemników CMA3-pozytywnych vs. <30% (metoda ICSI) (*Nasr-Esfahani i wsp.*, 2004),
- ≥40% plemników CMA3-pozytywnych vs. <40% (metoda IVF i ICSI) (*Tavalaee i wsp.*, 2009).

Na podstawie analizy krzywej ROC (ang. *receiver operating characteristic*) oraz pola powierzchni pod krzywą (AUC, ang. *area under curve*) wykazano, że testy AB, CMA3, SCD mają istotną wartość predykcyjną[1] dla uzyskania zapłodnienia w warunkach *in vitro*. Nie wykazano tej wartości dla testu OA (*Iranpour*, 2014; *Nasr-Esfahani i wsp.*, 2001; *Tang i wsp.*, 2020). Odpowiednio, była to:

- średnia wartość predykcyjna testu AB (AUC = 0,614 przy optymalnej wartości granicznej[2] 20% plemników AB-pozytywnych, metoda IVF) (*Nasr-Esfahani i wsp.*, 2001),
- średnia wartość predykcyjna testu CMA3 (AUC = 0,646 przy optymalnej wartości granicznej 48% plemników CMA3-pozytywnych, metoda ICSI) (*Iranpour*, 2014),
- satysfakcjonująca wartość testu SCD (AUC = 0,772 przy optymalnej wartości granicznej 31,25% SDF, metoda IVF) (*Tang i wsp.*, 2020),
- bardzo dobra wartość predykcyjna testu CMA3 (AUC = 0,911 przy optymalnej wartości granicznej 30% plemników CMA3-pozytywnych, metoda IVF) (*Nasr-Esfahani i wsp.*, 2001).

Wykazano także ujemną liniową zależność[3] (korelację) między odsetkiem plemników AB-pozytywnych (r = –0,342) (metoda IVF) (*Nasr-Esfahani i wsp.*, 2001), CMA3-pozytywnych (r = –0,291; –0,565; –0,564) (metody ICSI i IVF) (*Nasr-Esfahani i wsp.*, 2001, 2005; *Tavalaee i wsp.*, 2009), fragmentacją jądrowego DNA weryfikowaną testem kometowym (r = –0,318) (metoda IVF) (*Simon* i *Lewis*, 2011) oraz SDF (test SCD) (r = –0,245, r = –0,291) (metody IVF i ICSI) (*Muriel i wsp.*, 2006; *Tavalaee i wsp.*, 2009) a odsetkiem zapłodnionych oocytów. Co więcej, zaobserwowano, że wraz ze wzrostem odsetka SDF wydłużeniu ulega czas wytworzenia przedjądrzy będących markerem zapłodnienia – ujawniono dodatnią korelację (r = 0,473; metoda ICSI) między SDF a czasem pojawienia się przedjądrzy (*Wdowiak i wsp.*, 2015). Stwierdzono również, że iloraz szans (OR, ang. *odds ratio*)[4] na uzyskanie niskiego odsetka zapłodnionych oocytów (<40%) był 9,5-krotnie wyższy, gdy w nasieniu mężczyzn będących partnerami w niepłodnych parach leczonych metodą IVF odsetek plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA (test kometowy) wynosił >40 w odniesieniu do mężczyzn z ≤40% plemników z fragmentacją jądrowego DNA. Natomiast OR, zgodnie z oczekiwaniami, dla uzyskania wysokiego odsetka zapłodnionych oocytów (>70%) był 24,18-krotnie niższy (*Simon* i *Lewis*, 2011). W przypadku testu TUNEL również potwierdzono związek między odsetkiem zapłodnionych oocytów a odsetkiem plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA, np. w przypadku odsetka plemników TUNEL-pozytywnych <25 dla 43 par uzyskano >80% zapłodnionych oocytów, z kolei w przypadku odsetka plemników TUNEL-pozytywnych >25 dla żadnej z par nie uzyskano >80% zapłodnionych oocytów (*Lopes i wsp.*, 1998).

Wpływ statusu chromatyny plemników na uzyskanie zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody zapłodnienia *in vitro*

Lopes i wsp. (1998) ujawnili istotne ujemne korelacje (r = –0,230) między odsetkiem zapłodnionych oocytów a odsetkiem plemników TUNEL-pozytywnych w przypadku par leczonych metodą ICSI. Nie wykazali jednak tych korelacji, gdy zastosowano procedurę IVF. Także *Xue i wsp.* (2016) stwierdzili istotne ujemne korelacje (r = –0,433) między SDF a odsetkiem zapłodnionych oocytów tylko w grupie pacjentów leczonych metodą ICSI, nie wykazali ich w przypadku procedury IVF. Ponadto badacze ci uzyskali średnią wartość prognostyczną testu SCD dla zapłodnienia metodą ICSI (AUC = 0,680 przy optymalnej wartości granicznej 22,30% SDF). Przeciwne wyniki otrzymali inni autorzy (*Borini i wsp.*, 2006; *Pregl Breznik i wsp.*, 2013), którzy nie stwierdzili liniowego związku między wynikami testu TUNEL lub SCD a odsetkiem zapłodnionych oocytów w przypadku zastosowania procedury ICSI, ujawnili jednak ten związek w przypadku wykorzystania procedury IVF (odpowiednio: r = –0,219; r = –0,436). Kolejne badania przeprowadzone przez *Oleszczuk i wsp.* (2016) wykazały, że jeśli mężczyźni z par leczonych metodą IVF mieli ≤10% DFI, to uzyskano istotnie więcej zapłodnionych oocytów

1 Wartość predykcyjną danego testu określa się na podstawie wartości AUC. Interpretuje się ją w następujący sposób: doskonała wartość predykcyjna – AUC > 0,9–1,0, dobra wartość predykcyjna – AUC > 0,8–0,9, satysfakcjonująca wartość predykcyjna – AUC > 0,7–0,8, średnia wartość predykcyjna – AUC > 0,6–0,7, niewystarczająca wartość predykcyjna – AUC ≥ 0,5–0,6.

2 Optymalna wartość graniczna/wartość odcięcia to wartość, powyżej której statystycznie istotnie zwiększa się ryzyko zajścia badanego zjawiska.

3 Wartości współczynnika korelacji interpretuje się w następujący sposób: brak zależności liniowej – r < 0,2, słaba zależność – r > 0,2–0,4, umiarkowana zależność – >0,4–0,7, silna zależność – r > 0,7–0,9, bardzo silna zależność – r > 0,9.

4 OR – parametr określający stosunek szans na wystąpienie badanego zdarzenia w danej grupie w odniesieniu do szans na wystąpienie tego samego zdarzenie w innej grupie, będącej punktem odniesienia.

w porównaniu z parami, w których mężczyźni mieli >30% DFI, >20–30% DFI lub >10–20% DFI. Natomiast gdy w tych samych badaniach analizie poddano wyniki uzyskane dla grupy leczonej metodą ICSI, nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych. Podobnie *Simon i wsp.* (2010) wykorzystując procedurę IVF, uzyskali istotnie niższy odsetek zapłodnionych oocytów, kiedy w nasieniu odsetek plemników z obniżoną integralnością DNA (test kometowy) wynosił 61–100 w porównaniu z grupą mężczyzn, w nasieniu których stwierdzono 21–40% lub 0–20% plemników z pofragmentowanym DNA. Co więcej, autorzy ci uzyskali średnią wartość predykcyjną testu kometowego dla procesu zapłodnienia metodą IVF (AUC = 0,629 lub 0,648 przy optymalnych wartościach granicznych odpowiednio 56% i 44% plemników z pofragmentowanym DNA), natomiast nie wykazali opisanych zależności w grupie pacjentów leczonych metodą ICSI.

Przytoczone powyżej dane sugerują, że w większości badanych przypadków wyraźniejszy wpływ statusu chromatyny na proces zapłodnienia stwierdzany jest, gdy wykorzystuje się metodę IVF. Sugestię tę potwierdzają wyniki badań, w których nie obserwuje się związku między uszkodzeniami chromatyny plemników a procesem zapłodnienia, kiedy w analizach statystycznych łącznie analizuje się dane uzyskane z procedur IVF i ICSI (*Borini i wsp.*, 2006; *Oleszczuk i wsp.*, 2016). Wydaje się, że w tym aspekcie niebagatelne znaczenie ma omijanie przez plemnik naturalnych barier, które pozwalają na wyselekcjonowanie gamet najbardziej atrakcyjnych biologicznie również pod względem jakości chromatyny, koreluje ona bowiem ze strukturą i funkcją plemnika, co potwierdzają badania wielu autorów (*Evgeni i wsp.*, 2015; *Gill i wsp.*, 2019a, 2019b; *Homa i wsp.*, 2019; *Jakubik-Uljasz i wsp.*, 2020; *Lu i wsp.*, 2018; *Montjean i wsp.*, 2015; *Piasecka* i *Gill*, 2021). W przypadku procedury IVF plemnik musi wykazać zdolność do hiperaktywacji i wiązania się z kwasem hialuronowym wieńca promienistego zbudowanego z komórek ziarnistych otaczających komórkę jajową, co pozwala mu nie tylko przedostać się przez barierę utworzoną przez te komórki, ale także wyeksponować receptory dla komórki jajowej i w konsekwencji odbyć reakcję akrosomalną, i dalej przedostać się przez osłonę przejrzystą. Następna bariera, na jaką natrafia męska gameta, to oolemma – błona komórkowa oocytu. Tylko plemniki, które mają odpowiednie receptory, podlegają fuzji z oolemmą i są „wciągane" do cytoplazmy komórki jajowej (*Piasecka* i *Gill*, 2021). W przypadku zastosowania metody ICSI opisane powyżej naturalne bariery są pomijane.

Nieoczywisty wpływ statusu chromatyny plemników na uzyskanie zapłodnienia

Z przeglądu piśmiennictwa jednak wynika, że badania, których celem było m.in. znalezienie związku między statusem chromatyny plemników a procesem zapłodnienia w warunkach *in vitro*, nie zawsze dostarczają oczywistych i jednoznacznych danych. *Benchaib i wsp.* (2003) wykazali negatywny wpływ fragmentacji plemnikowego DNA (≥10% plemników TUNEL-pozytywny vs. <10%) na proces zapłodnienia, natomiast nie uzyskali statystycznie istotnych korelacji między odsetkiem plemników z pofragmentowanym DNA a odsetkiem zapłodnionych oocytów. W innych badaniach, pomimo że ujawniono istotnie niższy odsetek zapłodnionych oocytów dla par, w których mężczyźni mieli ≥10% plemników AB-pozytywnych (vs. <10%, metoda ICSI), nie wykazano tych różnic, gdy w nasieniu odsetek plemników AB-pozytywnych był wyższy (>20% vs. ≤20% lub >30% vs. ≤30%). Podobnie brak różnic statystycznie istotnych stwierdzono dla testu CMA3, OA i TB i nie ujawniono istotnych korelacji między wynikami zastosowanych testów a odsetkiem zapłodnionych oocytów (*Sadeghi i wsp.*, 2009). *Velez de la Calle i wsp.* (2008) wyróżniając grupę mężczyzn z różną wartością SDF (10%, 15%, 18%, 20% i 25%) (test SCD), wykazali, że jedynie wartość 18% SDF miała kliniczne znaczenie dla uzyskania zapłodnienia metodą IVF i ICSI (współczynnik regresji krokowej = −5,52). Co więcej, *Iranpour* (2014) z jednej strony wykazał istotne ujemne zależności między odsetkiem plemników CMA3-pozytywnych a odsetkiem zapłodnionych oocytów (metoda ICSI) (współczynnik regresji logarytmicznej = −0,052), z drugiej zaś nie stwierdził tych zależności w przypadku testów AB i OA (*Iranpour*, 2014). Z kolei *Tang i wsp.* (2020) ujawnili związek między SDF a odsetkiem zapłodnionych oocytów (metoda IVF), ale tylko w przypadku mężczyzn z astenozoopsermią. Autorzy ci uzyskali niższy odsetek zapłodnionych oocytów dla par, w których mężczyźni mieli astenozoospermię i SDF >31,25% w porównaniu z mężczyznami z astenozoospermią i z ≤31,25% SDF, natomiast nie wykazano tych różnic, gdy mężczyźni mieli normozoospermię i >31,25% SDF lub ≤31,25% SDF. Wyniki tych badań wyraźnie pokazują, że związek między SDF a procesem zapłodnienia może być zależny od heterogenności grup badanych mężczyzn.

Również badania autorskie (*Gill i wsp.*, 2018) prezentują niejednoznaczne dane. Wykazano w nich, że mężczyźni z par leczonych metodą ICSI, dla których uzyskano >50% zapłodnionych oocytów, mieli istotnie niższy odsetek plemników TB-pozytywnych w porównaniu z parami, dla których uzyskano ≤50% zapłodnionych oocytów. Co więcej, ujawniono, że test TB miał satysfakcjonującą wartość prognostyczną dla uzyskania >50% zapłodnionych oocytów (AUC = 0,705, przy optymalnej wartości granicznej 17% plemników TB-pozytywnych). Z drugiej strony nie zaobserwowano istotnych korelacji między odsetkiem plemników TB-pozytywnych oraz odsetkiem zapłodnionych oocytów, a w przypadku testu AB i CMA3 nie potwierdzono żadnych statystycznych zależności.

Brak wpływu statusu chromatyny plemników na uzyskanie zapłodnienia

Opublikowano również szereg doniesień naukowych, które niezależnie od metody oceny chromatyny plemników i zastosowanej procedury zapłodnienia pozaustrojowego nie wykazują zależności między jakością jądrowego DNA plemników a procesem zapłodnienia. W badaniach tych wykazuje się brak różnic w odsetku zapłodnionych oocytów między parami, w których mężczyźni mieli:

- >15% DFI vs. ≤15% (ICSI) (*Green i wsp.*, 2020),
- >15% HDS vs. 5–15% lub vs. <5% (IVF i ICSI) (*Lin i wsp.*, 2008),
- >15% HDS vs. ≤15% (IVF) (*Niu i wsp.*, 2011),
- ≥20% plemników TUNEL-pozytywnych vs. <20% (ICSI) (*Dariš i wsp.*, 2009),
- ≥20% SDF vs. <20% (IVF i ICSI) (*Sun i wsp.*, 2018),
- ≥21% SDF vs. 11–20% lub vs. ≤10% (IVF) (*Zheng i wsp.*, 2018),
- >23,3% plemników TUNEL-pozytywnych vs. ≤24,3% (IVF i ICSI) (*Henkel i wsp.*, 2003),
- >27% DFI vs. 9–27% lub vs. <9% (IVF i ICSI) (*Lin i wsp.*, 2008),
- >27% DFI vs. ≤27% (IVF) (*Niu i wsp.*, 2011),
- >29% plemników AB-pozytywnych vs. ≤29% (ICSI) (*Hammadeh i wsp.*, 1996),
- ≥30% DFI vs. >15–<30% lub vs. ≤15% (IVF i ICSI) (*Chen i wsp.*, 2020; *Yang i wsp.*, 2019),
- ≥30% SDF vs. <30% (IVF i ICSI) (*Borges i wsp.*, 2019; *Sun i wsp.*, 2018; *Sivanarayana i wsp.*, 2013; *Wang i wsp.*, 2014),
- >30% plemników ze denaturowanym DNA vs. >15–30% lub vs. 0–15% (ICSI) (*Zini i wsp.*, 2005),
- >35% SDF vs. ≤35% (IVF, ICSI) (*Anifandis i wsp.*, 2015),
- >36,5% plemników TUNEL-pozytywnych vs. ≤36,5% (IVF i ICSI) (*Henkel i wsp.*, 2003).

Ponadto nie wykazano różnic w odsetku zapłodnionych oocytów (metoda ICSI) w przypadku wykorzystania wyselekcjonowanego nasienia (komora ZyMōt™[5]) zawierającego średnio 1,2 ±0,4% plemników TUNEL-pozytywnych oraz wyselekcjonowanego nasienia (wirowania na gradiencie stężeń – DGC, ang. *density gradient centrifugation*) zawierającego średnio 18,5 ±11,00% plemników TUNEL-pozytywnych (*Parrella i wsp.*, 2019). Nie stwierdzono również istotnych korelacji między odsetkiem zapłodnionych oocytów a wynikami testu:

- AB (IVF i ICSI) (*Hammadeh i wsp.*, 1998; *Razavi i wsp.*, 2003; *Sadeghi i wsp.*, 2011),
- CMA3 (ICSI) (*Sadeghi i wsp.*, 2011),
- SCD (IVF i ICSI) (*Antonouli i wsp.*, 2019; *Tandara i wsp.*, 2014),
- SCSA (IVF i ICSI) (*Larson-Cook i wsp.*, 2003),
- TB (ICSI) (*Sadeghi i wsp.*, 2011).

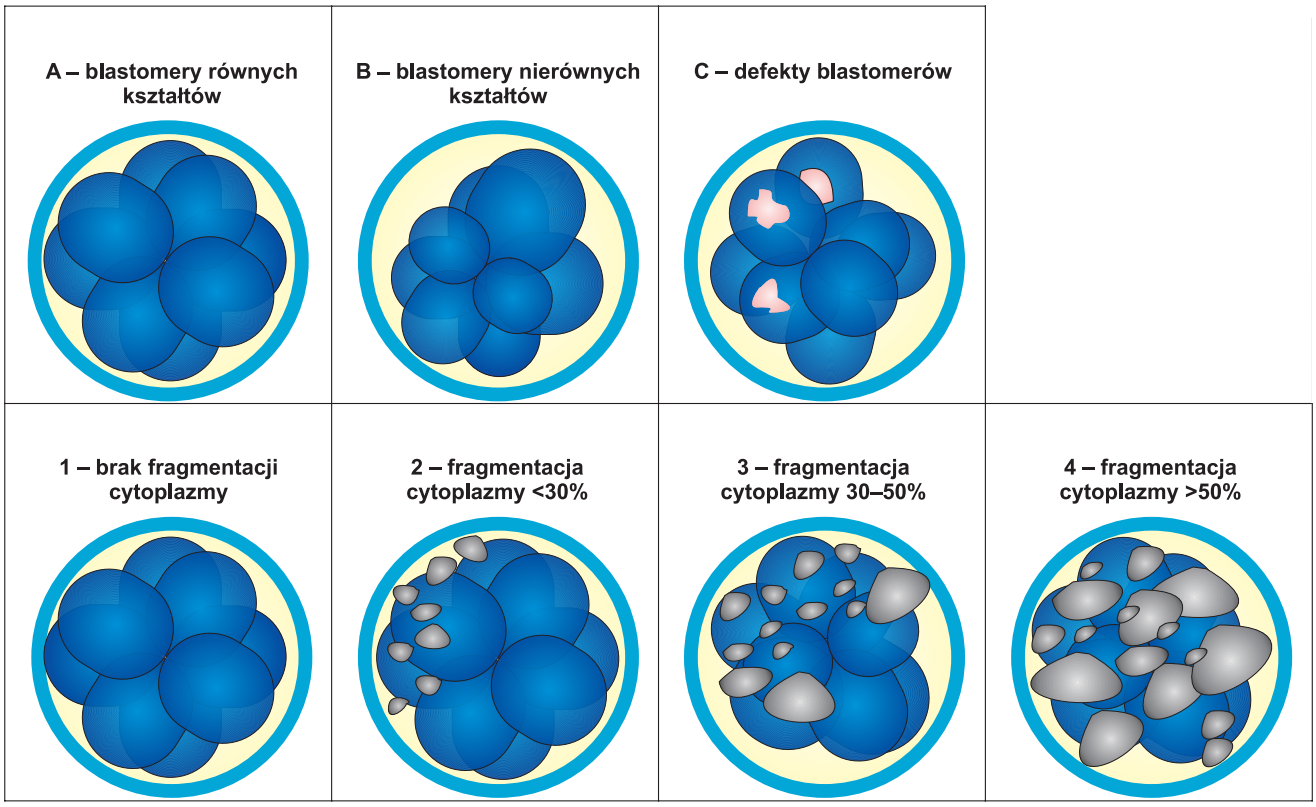
5 ZyMōt™ – urządzenie/komora wykorzystywana do selekcji męskich gamet wykorzystywanych w procedurach ART. Posiada ona specjalną membranę z porami o wielkości 8 µm, którą w założeniu producenta mogą pokonać jedynie plemniki wykazujące prawidłowy ruch postępowy i prawidłową budowę morfologiczną.

Wpływ statusu chromatyny plemników na rozwój zarodków w 2.–3. dobie po zapłodnieniu

W 2.–3. dobie po zapłodnieniu metodą *in vitro* ocenie podlega blastomerowa budowa zarodka. W 2. dobie między 26 h a 44 h ±1 h po zapłodnieniu powinien nastąpić podział mitotyczny zygoty (ang. *first cleavage*), w efekcie czego powstaje 2 blastomerowy zarodek. Kolejnej oceny dokonuje się w 44 h ±1 h po zapłodnieniu – prawidłowy zarodek wykazuje 4 blastomerową budowę. Z kolei po 68 h ±1 h prawidłowy embrion ma 8 blastomerową budowę. Poza liczbą blastomerów jednocześnie ocenie podlega ich symetria i jakość cytoplazmy. W efekcie stosuje się 3-znakowy system ewaluacji, gdzie pierwszy symbol – cyfra odpowiada liczbie blastomerów, drugi symbol – litera odpowiada wzajemnej symetryczności blastomerów (A – blastomery symetryczne; B – blastomery nierównych kształtów, C – cytoplazmatyczne defekty blastomerów), trzeci symbol – cyfra odpowiada stopniowi fragmentacji cytoplazmy (1 – brak fragmentacji cytoplazmy; 2 – fragmentacja <30%; 3 – fragmentacja 30–50%; 4 – fragmentacja cytoplazmy >50%) (rycina 3) (*Baczkowski i wsp.*, 2004; *ESHRE*, 2017; *Gill i wsp.*, 2018; *Nasiri* i *Eftekhari-Yazdi*, 2015; *Tang i wsp.*, 2020; *Wdowiak i wsp.*, 2015).

Wraz ze wzrostem odsetka plemników z obniżonym statusem chromatyny rośnie ryzyko nieprawidłowego rozwoju zarodka w 2.–3. dobie po zapłodnieniu

Wyniki badań *Velez de la Calle i wsp.* (2008) wskazują, że wraz ze wzrostem stopnia uszkodzeń chromatyny plemników maleje odsetek zarodków o prawidłowej budowie blastomerowej. Wykazano, że mężczyźni z par, dla których uzyskano zarodki o optymalnej budowie morfologicznej, w 2. dobie po zapłodnieniu (metody IVF i ICSI) mieli istotnie niższy odsetek SDF (22,32% SDF) niż mężczyźni z par, dla których uzyskano zarodki niższej jakości (22,41% SDF). Inne badania, przeprowadzone przez *Simon i wsp.* (2010), potwierdzają także wpływ jakości DNA plemników na wczesną embriogenezę w grupach leczonych metodą IVF i ICSI. Autorzy ujawnili większy odsetek zarodków morfologicznie prawidłowych w 3. dobie, u par, w których mężczyźni mieli 0–20% plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA (test kometowy) w porównaniu z parami, w których mężczyźni mieli 61–100% lub 41–60% plemników z nieprawidłową integralnością genomu plemników. W kolejnych badaniach ujawniono istotnie mniej zarodków morfologicznie prawidłowych ocenianych w 2. i 3. dobie po zapłodnieniu (metoda IVF i ICSI), gdy wykorzystano nasienie zawierające 71–100% plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA (test kometowy) vs. ≤30% plemników z pofragmentowanym jądrowym DNA (*Simon*



Ryc. 3. Schemat ilustrujący kryteria oceny budowy morfologicznej zarodków, przeprowadzanej w hodowli *in vitro*, w. 2.–3. dobie po zapłodnieniu. Górny panel odpowiednio: A – symetryczne blastomery; B – niesymetryczne blastomery; C – defekty cytoplazmy blastomerów. Dolny panel odpowiednio: 1 – brak fragmentacji cytoplazmy; 2 – fragmentacja cytoplazmy <30%; 3 – fragmentacja cytoplazmy 30–50%; 4 – fragmentacja cytoplazmy >50%. Opracowane na podstawie *Bączkowski i wsp.* (2004) oraz *ESHRE* (2017)

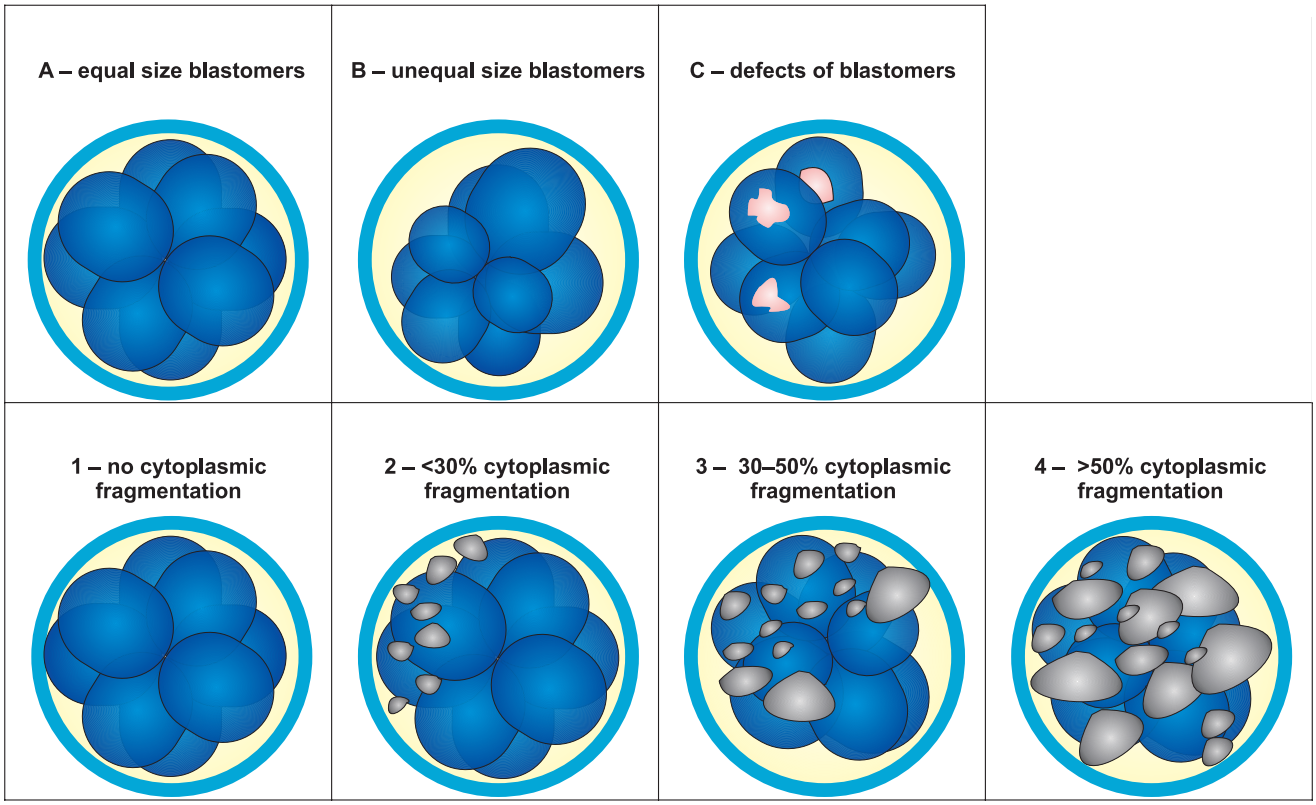


Fig. 3. Schema illustrating the criteria of embryo assessment in *in vitro* conditions on the 2nd–3th day after fertilization. Top panel: A – symmetrical blastomeres; B – asymmetrical blastomeres; C – cytoplasm defects of blastomers, respectively. Bottom panel: 1 – no cytoplasmic fragmentation; 2 – <30% of cytoplasmic fragmentation; 3 – 30–50% of cytoplasmic fragmentation; 4 – >50% of cytoplasmic fragmentation. Based on *Bączkowski et al.* (2004) and *ESHRE* (2017)

i wsp., 2014). Podobnie w innych publikacjach autorzy donoszą o uzyskaniu mniejszej liczby zarodków morfologicznie prawidłowych w 3. dobie dla par, w których mężczyźni mieli:

- ≥21% SDF vs. 11–20% lub vs. ≤10% (IVF) (*Zheng i wsp.*, 2018),
- >30% SDF vs. ≤30% (ICSI) (*Borges i wsp.*, 2019),
- ≥30% SDF vs. <30% (ICSI) (*Sivanarayana i wsp.*, 2013).

Co więcej, wykazano, że efekt dużego *halo*[6] w teście SCD miał dobrą wartość prognostyczną (AUC = 0,830, przy optymalnej wartości granicznej 28% plemników z dużym halo) dla prawidłowego rozwoju zarodków ocenianych w 3. dobie po zapłodnieniu metodą IVF, podczas gdy pełna ocena fragmentacji DNA plemników w tym teście (patrz przypis 6) miała satysfakcjonującą wartość prognostyczną (AUC = 0,710, przy optymalnej wartości granicznej 26% SDF) (*Tandara i wsp.*, 2014). Uzupełnieniem powyższych danych są wyniki badań, w których stwierdzono istotne ujemne korelacje między prawidłowym rozwojem zarodka w 2. i 3. dobie a fragmentacją jądrowego DNA ocenianą w teście kometowym (odpowiednio, r = −0,486 i r = −0,648; metoda ICSI) (*Nasr-Esfahani i wsp.*, 2005) oraz między prawidłowym rozwojem zarodka ocenianym w 3. dobie a wartością odsetka plemników TUNEL-pozytywnych (r = −0,640, metoda ICSI) (*Avendaño i wsp.*, 2010). Wartość przytoczonych współczynników korelacji nie wskazuje na słabą siłę asocjacji, lecz na umiarkowaną.

Nieoczywisty wpływ statusu chromatyny plemników na rozwój zarodka w 2.–3. dobie po zapłodnieniu

Nie można pominąć faktu, że związek między statusem chromatyny a rozwojem zarodka może być zależny m.in. nie tylko od liczby plemników z uszkodzoną chromatyną, ale także od doby rozwoju zarodka, zastosowanego testu weryfikującego dojrzałość i integralność chromatyny oraz wykorzystanej metody zapładniania *in vitro*. Wykazano bowiem istotne różnice w odsetku zarodków morfologicznie prawidłowych w 2. dobie, po zapłodnieniu metodą ICSI, uzyskanych dla par, w których mężczyźni mieli >30% lub >15–30% plemników ze zdenaturowanym DNA vs. 0–15% (test z OA), nie wykazując tych różnic w odsetku zarodków morfologicznie prawidłowych w 3. dobie (*Zini i wsp.*, 2005). Z kolei inne badania przeprowadzone przez *Niu i wsp.* (2011) na grupie pacjentów leczonych metodą IVF nie ujawniły istotnych różnic w odsetku zarodków morfologicznie prawidłowych w 2. dobie w zależności od odsetka plemników z nieprawidłowym statusem chromatyny (>27% DFI vs. ≤27% lub >15% HDS vs. ≤15%). Z drugiej strony autorzy ci ujawnili istotnie wyższy odsetek zarodków morfologicznie prawidłowych w 3. dobie (≤27% DFI vs. >27% DFI). Wyniki te potwierdzają również badania *Tang i wsp.* (2020), w których stwierdzono istotnie niższy odsetek prawidłowych zarodków w 3. dobie po zapłodnieniu metodą IVF uzyskany dla par, w których mężczyźni mieli astenozoospermię i >31,25% SDF w porównaniu z mężczyznami z astenozoospermią i ≤31,25% SDF, natomiast w badaniach tych nie wykazano różnic, gdy badani mieli normozoospermię i >31,25% SDF w porównaniu z mężczyznami z normozoospermią i ≤31,25% SDF.

Z kolei dane uzyskane przez *Sadeghi i wsp.* (2009) pokazują niebagatelne znaczenie zastosowanego testu weryfikującego status chromatyny plemników w przypadku oceny wpływu jej uszkodzeń na rozwój zarodków. Autorzy wykazali istotnie niższy odsetek prawidłowych zarodków w 3. dobie uzyskanych dla par, w których mężczyźni mieli ≥30% plemników CMA3-pozytywnych vs. <30% (metoda ICSI), jednak nie ujawnili tych różnic, kiedy zastosowano test AB, TB oraz OA. Zgodnie z sugestią *Sadeghi i wsp.* (2009) można uznać, że w przypadku badanej grupy mężczyzn poziom protaminacji chromatyny plemników (komórki CMA3-pozytywne z deficytem protamin) decydujący o jej upakowaniu mógł mieć istotny wpływ na rozwój zarodka w 3. dobie.

Inne badania, które obejmowały porównanie par, w których mężczyźni mieli >30% DFI, >20–≤30% DFI, >10–≤20% DFI lub ≤10% DFI, nie wykazały różnic w odsetku zarodków morfologicznie prawidłowych ocenianych zarówno w 2., jak i 3. dobie, gdy grupa badana nie była wyselekcjonowana w zależności od zastosowanej procedury zapłodnienia (IVF i ICSI). Natomiast gdy wyniki analizowano osobno dla grupy leczonej metodą IVF i grupy leczonej metodą ICSI, ocena statystyczna ujawniła wpływ uszkodzeń DNA plemników na rozwój zarodków: 1) dla wyizolowanej grupy pacjentów leczonych metodą IVF wykazano niższy iloraz szans na uzyskanie zarodków dobrej jakości w 2. dobie, gdy wartość DFI była >30% lub >20–≤30% vs. ≤10%, 2) dla wyizolowanej grupy pacjentów leczonych metodą ICSI stwierdzono istotnie niższy iloraz szans na osiągniecie zarodków o prawidłowej budowie w 2. dobie tylko w przypadku, gdy wartość DFI była >20–≤30% vs. ≤10% (*Oleszczuk i wsp.*, 2016).

Uzyskiwane przez badaczy korelacje między stopniem uszkodzenia plemnikowego DNA a rozwojem embrionalnym nie zawsze są oczywiste. Stwierdzono istotne dodatnie korelacje między SDF a czasem osiągnięcia przez zarodek stadium 2 blastomerów (r = 0,650), 3 blastomerów (r = 0,644) oraz 4 blastomerów (r = 0,677) po zapłodnieniu metodą ICSI, nie wykazano jednak tych zależności w przypadku osiągnięcia przez zarodek stadium 5, 6, 7, 8 i 9 blastomerów (*Wdowiak i wsp.*, 2015). W kolejnych badaniach także ujawniono istotne

6 Efekt *halo* w teście SCD tworzony jest przez pętle DNA wyrzucane poza główkę plemnika, jeśli genomowe DNA jest integralne. Efekt ten uznawany jest za duży (duże *halo*), gdy jego średnica jest ≥ od średnicy główki plemnika, a za średni, gdy średnica jest >⅓ średnicy główki. Natomiast jeśli *halo* jest ≤⅓ średnicy główki plemnika lub nie występuje mimo wybarwienie główki bądź też stwierdza się tylko częściowo wybarwioną główkę albo niewybarwioną, uznaje się, że genomowe DNA uległo fragmentacji.

ujemne korelacje (r = –0,242) między SDF a rozwojem zarodka ocenianego w 3. dobie po zapłodnieniu, ale metodą IVF. Nie stwierdzono tych korelacji w przypadku zapłodnienia metodą ICSI (*Pregl Breznik i wsp.*, 2013).

Brak wpływu statusu chromatyny plemników na rozwój zarodka w 2.–3. dobie po zapłodnieniu

Część autorów nie stwierdza statystycznie istotnego wpływu uszkodzeń chromatyny plemników na rozwój zarodków ocenianych w 2. i/lub 3. dobie. W badaniach tych nie wykazuje się różnic w odsetku zarodków morfologicznie prawidłowych, porównując zarodki uzyskane dla par, w których mężczyźni mieli:

- >15% HDS vs. 5–15% lub vs. <5% (IVF i ICSI) (*Lin i wsp.*, 2008),
- ≥20% SDF vs. <20% (IVF i ICSI) (*Sun i wsp.*, 2018),
- >22,30% SDF vs. ≤22,30% (IVF i ICSI) (*Xue i wsp.*, 2016),
- >27% DFI vs. 9–27% lub vs. <9% (IVF i ICSI) (*Lin i wsp.*, 2008),
- >29% plemników AB-pozytywnych vs. ≤29% (IVF) (*Hammadeh i wsp.*, 1996),
- ≥30% DFI vs >15–<30% lub vs. ≤15% (IVF i ICSI) (*Yang i wsp.*, 2019),
- ≥30% SDF vs. <30% (IVF i ICSI) (*Sun i wsp.*, 2018),
- >30% plemników CMA3-pozytywnych vs. <30% (ICSI) (*Nasr-Esfahani i wsp.*, 2004),
- >35% SDF vs. ≤35% (IVF i ICSI) (*Anifandis i wsp.*, 2015).

Niektórzy autorzy nie ujawnili również korelacji między parametrami morfokinetycznymi zarodków ocenianych w 2.–3. dobie po zapłodnieniu a wynikami testu AB (metody IVF i ICSI) (*Hammadeh i wsp.*, 1998; *Sadeghi i wsp.*, 2011), TUNEL (metody IVF i ICSI) (*Henkel i wsp.*, 2003), SCSA (metody IVF i ICSI) (*Larson-Cook i wsp.*, 2003) oraz SCD (metody IVF i ICSI) (*Muriel i wsp.*, 2006) Podobnie w badaniach autorskich (*Gill i wsp.*, 2018) nie stwierdzono różnic w odsetkach plemników AB-, TB- i CMA3-pozytywnych między mężczyznami z par, dla których osiągnięto >50% lub ≤50% zarodków morfologicznie prawidłowych w 3. dobie po zapłodnieniu metodą ICSI. Co więcej, w badaniach tych nie stwierdzono, aby testy te miały wartość predykcyjną dla uzyskania prawidłowych morfologicznie zarodków w 3. dobie po zapłodnieniu.

Wpływ statusu chromatyny plemników na rozwój zarodków w 4.–6. dobie po zapłodnieniu

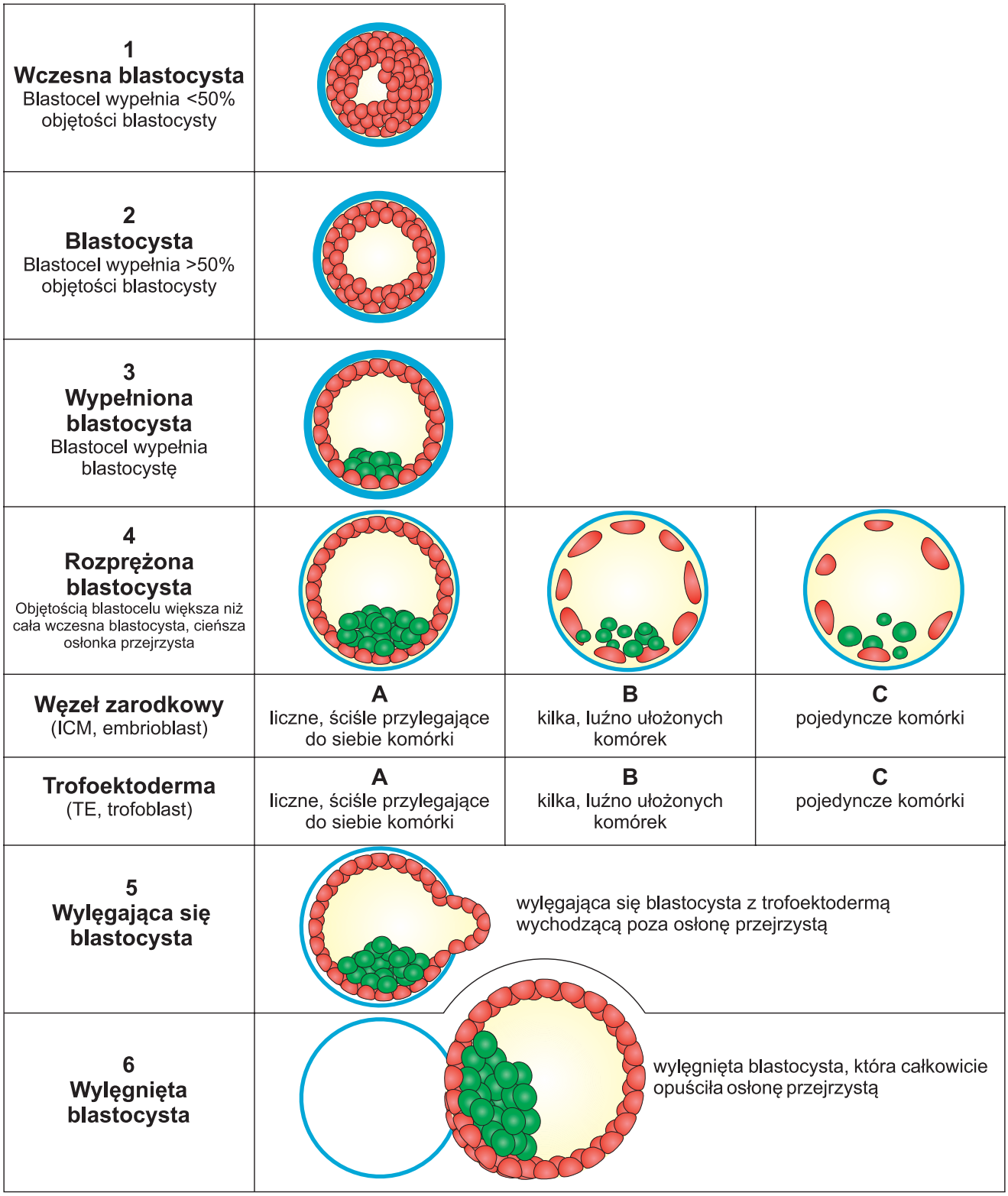
92 h ±2 h po zapłodnieniu embrion powinien znajdować się w stadium moruli zbudowanej z >10 ściśle przylegających do siebie blastomerów (kompakcja blastomerów) (*Kovacic i wsp.*, 2004). Następnie w 5. dobie (116 h ±2 h po zapłodnieniu) prawidłowo rozwijający się zarodek osiąga stadium blastuli i tworzy się jej jama (blastocel), która stopniowo zaczyna wypełniać zarodek. Wraz ze wzrostem objętości blastocelu pojawia się polaryzacja komórek, część komórek zgrupowanych na jednym z biegunów zarodka tworzy węzeł zarodkowy (embrioblast, ICM, ang. *inner cell mass*), natomiast druga pula komórek rozlokowana jest na obwodzie blastocysty i ulega spłaszczeniu, tworząc trofoektodermę (trofoblast, TE, ang. *trophoblast*). Jednocześnie blastocysta rozpręża się (objętość blastocelu staje się większa niż wczesna blastocysta), a osłona przejrzysta stopniowo staje się coraz cieńsza, co umożliwia wylęganie się zarodka przed jego implantacją do endometrium macicy (rycina 4) (*Baczkowski i wsp.*, 2004; *ESHRE*, 2017; *Gardner i wsp.*, 2000; *Gill i wsp.*, 2018; *Kovacic i wsp.*, 2004; *Nasiri i Eftekhari-Yazdi*, 2015; *Tang i wsp.*, 2020; *Wdowiak i wsp.*, 2015).

Wraz ze wzrostem odsetka plemników z obniżonym statusem chromatyny rośnie ryzyko nieprawidłowego rozwoju blastocysty

Wpływ jakości ojcowskiego materiału genetycznego na rozwój blastocysty potwierdzają publikacje, w których wykazano istotnie niższy odsetek zarodków osiągających stadium blastocysty dla par, w których mężczyźni mieli ≥10% plemników TUNEL-pozytywnych vs. <10% (metody IVF i ICSI) (*Benchaib i wsp.*, 2003), ≥21% SDF vs. 11–20% lub vs. ≤10% (metoda IVF) (*Zheng i wsp.*, 2018) lub ≥30% SDF vs. <30% (metoda ICSI) (*Borges i wsp.*, 2019; *Sivanarayana i wsp.*, 2013). Uzupełnieniem tych wyników są badania *Borges i wsp.* (2019), w których wykazano niższy odsetek blastocyst o prawidłowej budowie morfologicznej, gdy mężczyźni mieli ≥30% SDF vs. <30% (metoda ICSI). Stwierdzono także, że dla par, w których mężczyźni mieli 71–100% plemników z uszkodzonym DNA vs. 0–30% (test kometowy), osiągnięto istotnie więcej zarodków morfologicznie nieprawidłowych w 5. dobie po zapłodnieniu metodą IVF (*Simon i wsp.*, 2014).

Nieoczywisty wpływ statusu chromatyny plemników na rozwój blastocysty

Istnieją badania, w których nie wykazano korelacji między SDF a czasem osiągnięcia przez zarodek stadium moruli, natomiast wykazano istotne ujemne korelacje między SDF a czasem osiągnięcia stadium blastocysty (r = 0,537) po zapłodnieniu metodą ICSI (*Wdowiak i wsp.*, 2015). Z kolei w innych badaniach nie wykazano tej korelacji w przypadku ICSI, ale ujawniono ją, kiedy zastosowano metodę IVF (r = –0,310) (*Pregl Breznik i wsp.*, 2013). Interesujące wyniki opublikowali *Tang i wsp.*



Ryc. 4. Schemat ilustrujący kryteria oceny budowy morfologicznej zarodków osiągających stadium blastocysty, przeprowadzanej w hodowli *in vitro* w 5.–6. dobie po zapłodnieniu. Opracowane na podstawie *Bączkowski i wsp.* (2004), *Gardner i wsp.* (2000) oraz *ESHRE* (2017)

(2020), którzy wykorzystując procedurę IVF, wykazali istotnie niższy odsetek prawidłowych morfologicznie blastocyst uzyskanych dla par, w których mężczyźni mieli astenozoospermię i >31,25% SDF (vs. mężczyźni z astenozoospermią i z ≤31,25% SDF). Natomiast w przypadku par, w których mężczyźni mieli >31,25% SDF vs. ≤31,25% i jednocześnie normozoospermię, tych różnic nie wykazano.

Warto podkreślić, że zarówno w przypadku analizy odsetka zarodków morfologicznie prawidłowych ocenianych w 5. dobie po zapłodnieniu dla całej badanej grupy pacjentów (bez uwzględnienia rodzaju procedury

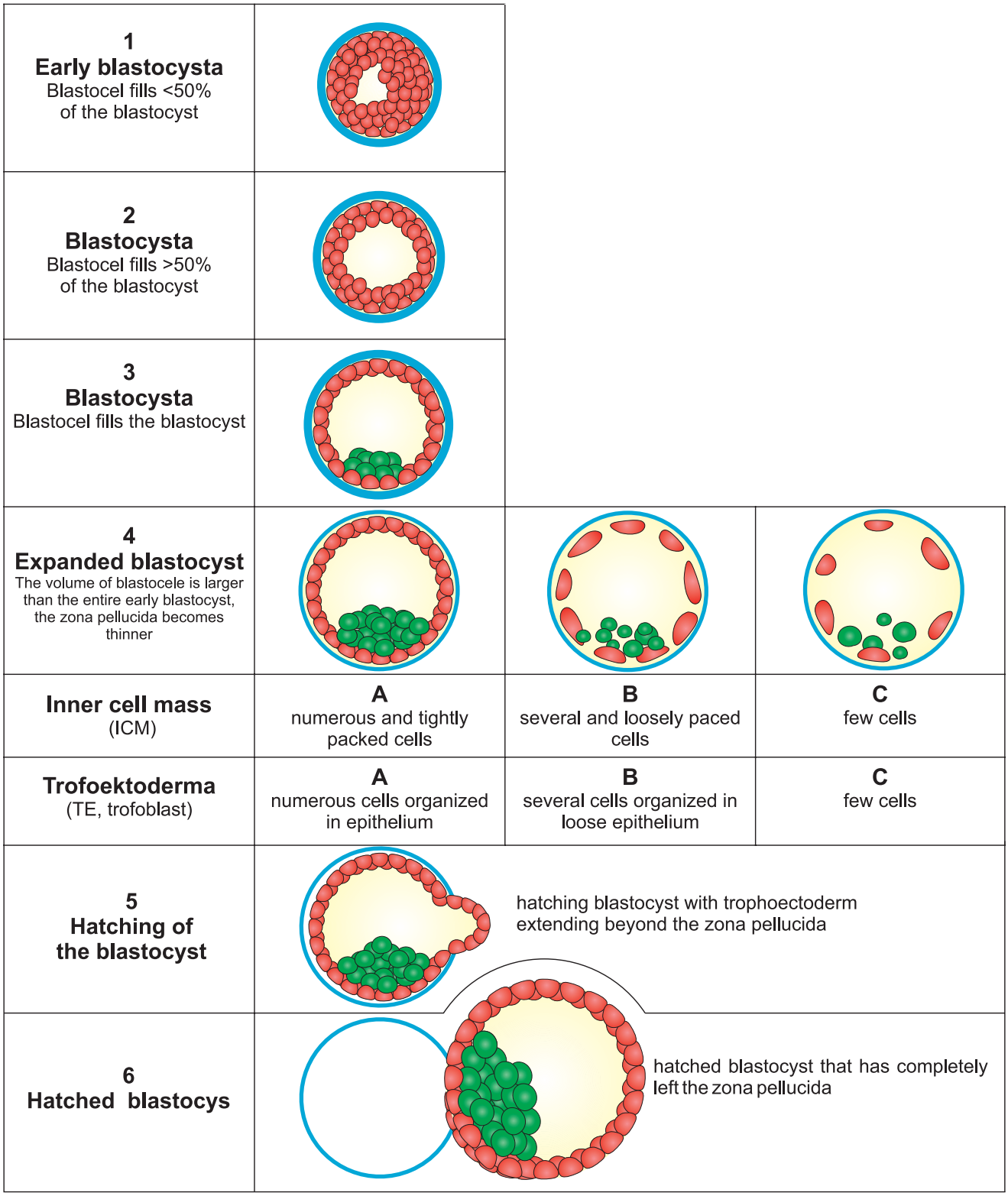


Fig. 4. Schema illustrating the criteria of embryo development in blastocyst stage assessment in *in vitro* conditions on the 5th–6th day after fertilization. Based on *Bączkowski et al.* (2004), *Gardner et al.* (2000) and *ESHRE* (2017)

zapłodnienia pozaustrojowego), jak i dla wyizolowanych grup leczonych metodą IVF i ICSI nie ujawniono różnic statystycznie istotnych między parami, w których mężczyźni mieli >30% DFI, >20–≤30% DFI lub >10–≤20% DFI (vs. ≤10%) (*Oleszczuk i wsp.*, 2016). Natomiast gdy podjęto próbę oszacowania ilorazu szans na uzyskanie zarodków dobrej jakości w 5. dobie, wyniki analizy statystycznej były różne w zależności od zastosowanej metody zapłodnienia *in vitro*. Istotnie niższy iloraz szans na uzyskanie zarodków stwierdzono w przypadku par leczonych metodą IVF, w których mężczyźni mieli >30% DFI lub >20–≤30% DFI (vs. ≤10%), z kolei w przypadku par

leczonych metodą ICSI wykazano niższy iloraz szans tylko dla par, w których mężczyźni mieli >20–≤30% DFI (vs. ≤10%) (*Oleszczuk i wsp.*, 2016).

Brak wpływu statusu chromatyny plemników na rozwój blastocysty

Nie zawsze potwierdza się związek między uszkodzeniami chromatyny a rozwojem blastocysty. *Green i wsp.* (2020) nie zaobserwowali różnic w liczbie blastocyst między grupami, w których mężczyźni mieli >15% DFI vs. ≤15% (metoda ICSI). Podobnie w opisanych już badaniach przeprowadzonych przez *Parrella i wsp.* (2019) nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w odsetku zarodków morfologicznie prawidłowych w 5. dobie (metoda ICSI), gdy porównywano pary, dla których po selekcji nasienia (komora ZyMōt) uzyskano średnio 1,20 ±0,40% plemników TUNEL-pozytywnych vs. pary, dla których uzyskano średnio 18,50 ±11,00% plemników TUNEL-pozytywnych (metoda DGC). Co więcej, w innych badaniach nie wykazano istotnych korelacji między rozwojem zarodka w 5. dobie a wynikami testu SCSA (metody IVF i ICSI) (*Larson-Cook i wsp.*, 2003) oraz SCD (metody IVF i ICSI) (*Antonouli i wsp.*, 2019; *Muriel i wsp.*, 2006). Również badania autorskie (*Gill i wsp.*, 2018) nie ujawniły różnic w odsetkach plemników AB-, TB- i CMA3-pozytywnych między mężczyznami z par, dla których osiągnięto >50% lub ≤50% zarodków morfologicznie prawidłowych w 5. dobie po zapłodnieniu metodą ICSI, jak również nie wykazały, aby testy te miały wartość predykcyjną dla uzyskania >50% morfologicznie prawidłowych blastocyst po procedurze ICSI.

Wpływ statusu chromatyny plemników na uzyskanie ciąży

W badaniach dotyczących wpływu statusu chromatyny męskich gamet na sukces rozrodczy w warunkach *in vitro* stosuje się wiele różnych parametrów będących miarą tego sukcesu. Zaliczyć do nich można: 1) Uzyskanie tzw. ciąży biochemicznej (ang. *biochemical pregnancy*), którą potwierdza się na podstawie oceny wzrostu poziomu podjednostki β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (β-hCG, ang. *human chorionic gonadotropin β-subunit*) we krwi obwodowej kobiety. Badanie to wykonywane jest 12–14 dni po transferze zarodka z hodowli *in vitro* do macicy. 2) Odsetek implantacji (ang. *implantation rate*), który określany jest w oparciu o potwierdzenie, w badaniu ultrasonograficznym, obecności pęcherzyka ciążowego. Badanie to wykonywane jest w 4.–5. tygodniu ciąży. 3) Uzyskanie tzw. ciąży klinicznej (ang. *clinical pregnancy*), której potwierdzeniem jest zarejestrowanie w badaniu ultrasonograficznym bicia serca płodu. Badanie to przeprowadzane jest od 6. tygodnia ciąży. Co więcej, weryfikacji poddaje się asocjacje między statusem chromatyny plemników a występowaniem poronień oraz żywych urodzeń (*Avendaño i wsp.*, 2010; *Borges i wsp.*, 2019; *Bounartzi i wsp.*, 2016; *Gill i wsp.*, 2018; *Jerre i wsp.*, 2019; *Parrella i wsp.*, 2019; *Simon i wsp.*, 2011, 2014; *Tandara i wsp.*, 2014).

Wraz ze wzrostem odsetka plemników z obniżonym statusem chromatyny rośnie ryzyko braku uzyskania ciąży i wystąpienia poronień

Podobnie jak w przypadku rozwoju zarodków w hodowli *in vitro*, tak też w przypadku uzyskania ciąży i jej prawidłowego przebiegu obserwuje się istotną rolę dojrzałości i integralności chromatyny plemników. Potwierdzają to wyniki badań, w których wykazano istotnie niższy odsetek uzyskanych ciąż biochemicznych, implantacji i/lub ciąż klinicznych, gdy mężczyźni mieli:

- 18,50% plemników TUNEL-pozytywnych vs. 1,20% (ICSI) (*Parrella i wsp.*, 2019),
- ≥30% SDF vs. ≤30% (ICSI) (*Sivanarayana i wsp.*, 2013),
- 50,30% plemników z pofragmentowanym DNA (test kometowy) vs. 23,20% (IVF) (*Simon i wsp.*, 2011),
- 68,50% plemników z pofragmentowanym DNA (test kometowy) vs. 33,80% (IVF) (*Simon i wsp.*, 2011),
- 71–100% plemników z pofragmentowanym DNA (test kometowy) vs. 0–30% (IVF i ICSI) (*Simon i wsp.*, 2014).

Wartość predykcyjna testów oceniających jakość plemnikowej chromatyny także potwierdza wpływ uszkodzeń chromatyny plemników na uzyskanie ciąży. Ujawniono, że efekt dużego *halo* oceniany w teście SCD miał satysfakcjonującą wartość predykcyjną dla uzyskania ciąży klinicznej (AUC = 0,750, wartość graniczna 38% z dużym *halo*), podczas gdy pełna ocena fragmentacji DNA plemników w tym teście (patrz przypis 6) miała średnią wartość predykcyjną (AUC = 0,670, wartość graniczna 29% SDF) (*Tandara i wsp.*, 2014). Podobne wyniki wykazano w innych badaniach, w których uzyskano satysfakcjonującą wartość kliniczną testu SCD dla prognozowania uzyskania ciąży klinicznej po procedurze IVF i ICSI (AUC = 0,700, brak podanej wartości granicznej) (*Bounartzi i wsp.*, 2016) bądź też testu TUNEL (AUC = 0,700, przy optymalnej wartości granicznej 17,6% plemników TUNEL-pozytywnych, metoda ICSI) (*Avendaño i wsp.*, 2010). Uzupełnieniem tych ostatnich wyników było oszacowanie ilorazu szans na uzyskanie ciąży w zależności od empirycznie wyliczonej wartości granicznej odsetka plemników TUNEL-pozytywnych. Dla par, w których mężczyźni mieli >17,6% plemników TUNEL-pozytywnych, iloraz szans na osiągnięcie ciąży był 3,5-krotnie niższy niż w przypadku mężczyzn z ≤17,6% plemników TUNEL-pozytywnych.

Lepszą wartość prognostyczną uzyskano dla testu kometowego. Wykorzystując do zapłodnienia IVF plemniki wyselekcjonowane (metoda DGC) lub gamety nieselekcjonowane, wykazano odpowiednio dobrą wartość

predykcyjną (AUC = 0,879, przy optymalnej wartości granicznej 42% plemników z fragmentacją DNA) oraz bardzo dobrą wartość predykcyjną (AUC = 0,905, przy optymalnej wartości granicznej 52% plemników z fragmentacją DNA) testu kometowego dla uzyskania ciąży klinicznej (*Simon i wsp.*, 2011). Co więcej, w badaniach tych wykazano, że iloraz szans dla braku ciąży był aż 24,18-krotnie wyższy, gdy w wyselekcjonowanym nasieniu (metoda DGC) stwierdzano >42% plemników z uszkodzoną chromatyną, oraz 76,00-krotnie wyższy, kiedy w nieselekcjonowanym nasieniu stwierdzono >52% plemników z pofragmentowanym DNA (*Simon i wsp.*, 2011).

Wykazano także, że uszkodzenia jądrowego DNA plemników mogą wpływać na wzrost ryzyka poronień, które częściej występowały u par, w których mężczyźni mieli ≥30% SDF vs. ≤30% (metoda ICSI) (*Sivanarayana i wsp.*, 2013). Co więcej, ujawniono niemal 1,5-krotnie wyższe ryzyko wczesnych poronień (≤12. tydzień ciąży), gdy mężczyźni mieli >15% HDS vs. ≤15% (metody IVF i ICSI) (*Jerre i wsp.*, 2019). Wykazano również, że wraz ze wzrostem uszkodzeń ojcowskiego materiału genetycznego ≥30% SDF vs. ≤30% (metoda ICSI) zmniejsza się liczba ciąż zakończonych porodem (*Sivanarayana i wsp.*, 2013). Potwierdzają to również wyniki badań opublikowanych przez *Parrella i wsp.* (2019). Istotnie więcej ciąż zakończonych porodem (procedura ICSI) stwierdzono, gdy do zapłodnienia wykorzystano wyselekcjonowane nasienie (komora ZyMōt), w którym było średnio 1,20 ±0,40% plemników TUNEL-pozytywnych w porównaniu z wyselekcjonowanym nasieniem (metoda DGC), w którym było średnio 18,50 ±11,00% plemników TUNEL-pozytywnych.

Wpływ statusu chromatyny plemników na uzyskanie ciąży i wystąpienie poronień w zależności od zastosowanej metody zapłodnienia *in vitro*

Nie ulega wątpliwości, że sukces rozrodczy zapłodnienia pozaustrojowego w postaci ciąży może być zależny zarówno od liczby plemników z uszkodzoną chromatyną, jak i rodzaju zastosowanej procedury. *Borini i wsp.* (2006) wykazali istotnie wyższy odsetek uzyskanych ciąż klinicznych oraz niższy odsetek poronień przy zastosowaniu procedury ICSI, gdy mężczyźni mieli ≤10% plemników TUNEL-pozytywnych vs. >10%. Gdy autorzy zastosowali metodę IVF, nie uzyskali różnic w badanych parametrach między porównywanymi grupami. Odmienne wyniki zaprezentowali *Henkel i wsp.* (2003). Jeśli pacjenci leczeni metodą IVF mieli >36,5% plemników TUNEL-pozytywnych, uzyskiwano niższy odsetek ciąż vs. ≤36,5%. Nie wykazano tych różnic w przypadku par leczonych metodą ICSI (>24,3% vs. ≤24,3% plemników TUNEL-pozytywnych). Z kolei *Oleszczuk i wsp.* (2016) u pacjentów leczonych metodą IVF i ICSI nie stwierdzili istotnych różnic w szansach na uzyskanie ciąży biochemicznej, gdy mężczyźni mieli >30% DFI, >20–≤30% DFI oraz >10–≤20% DFI vs. ≤10%. Natomiast ci sami autorzy wykazali istotnie wyższy iloraz szans na wystąpienie poronień, gdy wartość DFI wynosiła >40%, ale tylko gdy rozpatrywano całą grupę bez podziału na rodzaj procedury zapłodnienia. Z kolei kiedy z badanej grupy wydzielono pary leczone metodą IVF i ICSI, szansa na urodzenie żywego dziecka była istotnie niższa, gdy DFI wynosiło >20% DFI vs. ≤10%, ale tylko w przypadku procedury IVF. Brak istotnych różnic w szansach na urodzenie żywego potomstwa uzyskano w przypadku procedury ICSI (*Oleszczuk i wsp.*, 2016). Wyniki *Oleszczuk i wsp.* (2016) częściowo zgodne są z danymi uzyskanymi przez *Simon i wsp.* (2010). Ci ostatni autorzy wykazali średnią wartość predykcyjną testu kometowego (AUC = 0,648, przy optymalnej wartości granicznej 56% plemników z fragmentacją DNA lub AUC = 0,629, przy optymalnej wartości granicznej 44% plemników z fragmentacją DNA) dla uzyskania ciąży, ale tylko w przypadku zastosowania procedury IVF. Szansa na uzyskanie ciąży była 4,52-krotnie oraz 6,20-krotnie wyższa, gdy mężczyźni mieli odpowiednio <56% lub <44% plemników z pofragmentowanym DNA w porównaniu z mężczyznami z odpowiednio >56% lub >44% plemników z pofragmentowanym DNA.

Nieoczywisty wpływ statusu chromatyny plemników na uzyskanie ciąży i wystąpienie poronień

Nieoczywisty wpływ uszkodzeń chromatyny plemników obserwuje się nie tylko w przypadku procesu zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego, ale również w przypadku uzyskania i przebiegu ciąży. Wykazano bowiem, że dla par leczonych metodą ICSI, w których mężczyźni mieli ≥30% SDF, uzyskano istotnie niższy odsetek implantacji oraz wyższy poronień vs <30% SDF. Nie wykazano jednak różnic w odsetku ciąż biochemicznych i klinicznych (*Borges i wsp.*, 2019). W innych badaniach nie tylko ujawniono różnice w odsetku implantacji, ale także ciąż klinicznych (metoda IVF) między grupami, w których mężczyźni mieli ≥21% SDF vs. 11–20% SDF lub vs. ≤10%. Nie wykazano jednak różnic w częstości poronień (*Zheng i wsp.*, 2018). Co więcej, stwierdzono ujemne korelacje (r = −0,250) między SDF (*Muriel i wsp.*, 2006) a odsetkiem implantacji (metody IVF i ICSI), ale nie ujawniono tych korelacji między SDF (*Muriel i wsp.*, 2006) lub DFI (metody IVF i ICSI) (*Larson-Cook i wsp.*, 2003) a odsetkiem ciąż odpowiednio klinicznych i biochemicznych. Jedni badacze stwierdzili, niezależnie od zastosowanej procedury zapłodnienia *in vitro*, brak ciąży, gdy wartość DFI była >27% (*Larson-Cook i wsp.*, 2003). Drudzy natomiast nie wykazali różnic w odsetku uzyskanych ciąż klinicznych (metody IVF i ICSI) między grupami, w których mężczyźni mieli >27% DFI vs. 9–27%

DFI lub vs. <9% oraz >15% HDS vs. 5–15% HDS lub vs. <5%. Wykazano jednak wyższą częstość poronień w grupach, w których mężczyźni mieli >27% DFI i >15 HDS (*Lin i wsp.*, 2008). Ujawniono również, że grupa płodnych mężczyzn (ciąża osiągnięta drogą naturalną) oraz grupa mężczyzn z par, dla których procedura IVF i ICSI zakończyła się uzyskaniem ciąży klinicznej, mieli istotnie niższy odsetek DFI (odpowiednio: 15% i 21% DFI) niż grupa mężczyzn z par, dla których mimo zastosowania zapłodnienia pozaustrojowego nie udało się uzyskać ciąży (38% DFI). Jednak grupy te nie różniły się odsetkiem HDS (*Saleh i wsp.*, 2003). Wyniki te mogły sugerować, że w badanych przypadkach integralność genomu plemników miała większy wpływ na uzyskanie ciąży niż zwiększona zawartość histonów w ich chromatynie.

Ciekawe wyniki badań uzyskali *Jin i wsp.* (2015). Autorzy stwierdzili istotny spadek odsetka implantacji, klinicznych ciąż i żywych urodzeń oraz wzrost częstości poronień u par (metody IVF i ICSI), w których kobiety miały zredukowaną rezerwę jajnikową, a mężczyźni mieli >27,3% SDF w porównaniu z kobietami ze zmniejszoną rezerwę jajnikową i mężczyznami z ≤27,3% SDF. Jednak w przypadku gdy kobiety miały prawidłową rezerwę jajnikową, a mężczyźni >27,3% lub ≤27,3% SDF, wyniki te nie zostały potwierdzone, co sugeruje niezwykle istotną rolę czynnika żeńskiego w prognozowaniu sukcesu reprodukcyjnego. Równie interesujące dane uzyskali *Tang i wsp.* (2020), którzy stwierdzili istotnie mniej ciąż klinicznych uzyskanych dla par (metoda IVF), w których mężczyźni mieli astenozoospermię i >31,25% SDF vs. astenozoospermie i ≤31,25% SDF, natomiast nie stwierdzili istotności statystycznej, gdy porównywano mężczyzn z normozoospermią (>31,25% SDF vs. ≤31,25%).

Brak wpływu statusu chromatyny plemników na uzyskanie ciąży i wystąpienie poronień

Nie wszystkie opublikowane dane potwierdzają wpływ uszkodzeń plemnikowej chromatyny na uzyskanie ciąży. Wielu autorów nie stwierdza zależności między ciążą a poziomem uszkodzenia chromatyny plemników. W badaniach tych nie wykazuje się różnic w częstości osiąganych ciąż biochemicznych, implantacji i/lub ciąż klinicznych między parami, w których mężczyźni mieli:

- >15% HDS vs. ≤15% (IVF) (*Niu i wsp.*, 2011),
- >15% DFI vs. ≤15% (ICSI) (*Green i wsp.*, 2020),
- ≥20% SDF vs. <20% (IVF i ICSI) (*Sun i wsp.*, 2018),
- >22,30% SDF vs. ≤22,30% (IVF i ICSI) (*Xue i wsp.*, 2016),
- >25% SDF vs. <25% (ICSI) (*Antonouli i wsp.*, 2019)
- >27% DFI vs. ≤27% (IVF) (*Niu i wsp.*, 2011),
- >29% plemników AB-pozytywnych vs. odpowiednio ≤29% (IVF) (*Hammadeh i wsp.*, 1996),
- >30% plemników ze denaturowanym DNA vs. >15–30% lub vs. 0–15% (ICSI) (*Zini i wsp.*, 2005),
- >30% DFI vs. 15–30% lub vs. <15% (IVF i ICSI) (*Chen i wsp.*, 2020),
- ≥30% DFI vs. >15–<30% lub vs. ≤15% (IVF i ICSI) (*Yang i wsp.*, 2019),
- ≥30% SDF vs. <30% (IVF i ICSI) (*Sun i wsp.*, 2018; *Wang i wsp.*, 2014),
- >35% SDF vs. ≤35% (IVF i ICSI) (*Anifandis i wsp.*, 2015).

Na brak wpływu statusu chromatyny na uzyskanie ciąży wskazuje się również w publikacjach, w których autorzy porównują odsetki plemników z uszkodzoną chromatyną między mężczyznami z par, dla których uzyskano ciążę biochemiczną, implantację i/lub ciążę kliniczną a mężczyznami z par, dla których implantacji i ciąż tych nie uzyskano. W badaniach tych nie wykazano różnic w odsetku plemników:

- AB-pozytywnych (IVF i ICSI) (*Gill i wsp.*, 2018; *Bichara i wsp.*, 2019),
- CMA3-pozytywnych (IVF i ICSI) (*Gill i wsp.*, 2018; *Tavalaee i wsp.*, 2009),
- TB-pozytywnych (ICSI) (*Gill i wsp.*, 2018),
- TUNEL-pozytywnych (IVF i ICSI) (*Bichara i wsp.*, 2019),
- z dużymi wakuolami w obrębie główki będącymi wyrazem masywnych zaburzeń kondensacji chromatyny plemników (IVF i ICSI) (*Bichara i wsp.*, 2019),
- z nieprawidłową dyspersją chromatyny (test SCD) (IVF i ICSI) (*Tavalaee i wsp.*, 2009; *Velez de la Calle i wsp.*, 2008; *Wang i wsp.*, 2014).

Ponadto istnieją doniesienia, w których nie wykazuje się wartości predykcyjnej testów weryfikujących status chromatyny (test AB, CMA3, SCD i TB) dla uzyskania ciąży biochemicznej lub klinicznej (*Gill i wsp.*, 2018; *Sun i wsp.*, 2018) bądź też korelacji między wynikami zastosowanych testów a odsetkiem uzyskanych ciąż biochemicznych lub klinicznych (*Antonouli i wsp.*, 2019; *Gill i wsp.*, 2018; *Velez de la Calle i wsp.*, 2008). Nie obserwuje się także istotnego wzrostu częstości poronień między parami, w których mężczyźni mieli:

- >15% HDS vs. ≤15% (IVF) (*Niu i wsp.*, 2011),
- >15% DFI vs. ≤15% (ICSI) (*Green i wsp.*, 2020),
- >22,30% SDF vs. ≤22,30% (IVF i ICSI) (*Xue i wsp.*, 2016),
- >27% DFI vs. ≤27% (IVF) (*Niu i wsp.*, 2011),
- >30% SDF vs. ≤30% (ICSI) (*Wang i wsp.*, 2014),
- >30% DFI vs. 15–30% DFI lub vs. <15% (ICSI) (*Chen i wsp.*, 2020)
- ≥30% DFI vs. >15–<30% lub vs. ≤15% (IVF i ICSI) (*Yang i wsp.*, 2019).

Nie potwierdzono także różnic w odsetku DFI między parami, u których wystąpiło lub nie wystąpiło poronienie (metody IVF i ICSI) (*Yang i wsp.*, 2019). Podobnie w innych badaniach nie wykazano różnic w odsetku SDF między parami, u których ciąże po procedurach IVF i ICSI zakończyły się porodem, a parami, u których brak było ciąż zakończonych porodem (*Velez de la Calle i wsp.*, 2008).

Postępowanie terapeutyczne w celu zwiększenie szans na posiadanie potomstwa w zależności od poziomu uszkodzenia chromatyny plemników

Postępowanie terapeutyczne w męskiej niepłodności powinno jednocześnie uwzględniać wyniki podstawowego badania nasienia, oceny jakości chromatyny plemników, czas starania się o potomstwo, wiek partnerów oraz występowanie żeńskiego czynnika niepłodności. W przypadku normozoospermii, niskiego stopnia uszkodzeń DNA plemników (0–15% DFI), braku czynnika żeńskiego, relatywnie młodego wieku obojga partnerów i okresu starania się o potomstwo <2 lat można rozważać kontynuowanie starań mających na celu osiągnięcie spontanicznej ciąży. Natomiast gdy mimo prawidłowych wyników badań ginekologicznych i andrologicznych czas ten wynosi ponad 2 lata, należy rozważyć zastosowanie inseminacji domacicznej (IUI, ang. *intrauterine insemination*). Procedura ta może być także wykorzystana, gdy mimo prawidłowego odsetka plemników z uszkodzoną chromatyną zdiagnozowano łagodny czynnik męski (np. nieznaczne obniżenie standardowych parametrów seminologicznych) lub gdy potwierdzono czynnik żeński niepłodności, w przypadku którego IUI jest rekomendowana (np. tzw. wrogi śluz szyjki macicy lub zespół Mariona-Simsa[7]) (*Bungum i wsp.*, 2011; *Cho* i *Agarwal*, 2017; *Esteves* 2016, 2019; *Majzoub i wsp.*, 2019; *Tesarik* i *Galán-Lázaro*, 2017).

U pacjentów, u których zostanie zdiagnozowany podwyższony odsetek plemników z nieprawidłowym statusem chromatyny (>15%, szczególnie >30% DFI), należy zastosować indywidualnie dobraną strategię terapeutyczną, mającą na celu poprawę parametrów nasienia (identyfikacja i eliminacja czynników takich jak: żylaki powrózka nasiennego, nieprawidłowa masa ciała, niezdrowe nawyki behawioralne, infekcje i stany zapalne układu moczowo-płciowego, stres oksydacyjny nasienia i inne), tym samym zwiększając szanse na uzyskanie ciąży w sposób naturalny lub dzięki IUI. W sytuacji braku powodzenia (>20% DFI szansa na uzyskanie ciąży naturalnej i uzyskanej po IUI zmniejsza się, a >25% DFI jest zdecydowanie niższa) lub gdy zastosowanie IUI nie ma medycznego uzasadnienia (np. ciężka oligozoospermia, astenozoospermia, brak jajowodów nienaprawialne ich uszkodzenia, endometrioza III i IV stopnia, nosicielstwo chorób wirusowych przez jednego z pacjentów), należy rozważyć wykorzystanie bardziej zaawansowanych metod leczenia niepłodności obejmujących zapłodnienie *in vitro* z wykorzystaniem nasienia ejakulowanego (IVF, ICSI lub IMSI), przy czym nie można pominąć faktu, że wartość DFI >40% może być przyczyną poronień i braku ciąży. Niepowodzenia zastosowanych procedur lub inne wskazania (np. azoospermia) mogą uzasadniać wykorzystanie do zapłodnienia plemników pobranych z najądrza (MESA-ICSI), bądź też z jądra (TESE-ICSI). Należy jednak podkreślić, że w przypadku braku sukcesu terapeutycznego licznych wcześniejszych procedur, nawracających poronień oraz ryzyka transmisji choroby genetycznej na kolejne pokolenie jako opcję można rozważyć zapłodnienie nasieniem dawcy, adopcję prenatalną (transfer zarodków innej pary) czy też adopcję dziecka (*Bungum i wsp.*, 2011; *Cho* i *Agarwal*, 2017; *Esteves* 2016, 2019; *Evenson*, 2017; *Łukszuk i wsp.*, 2018; *Majzoub i wsp.*, 2019; *Marchlewska i wsp.*, 2021; *Tesarik* i *Galán-Lázaro*, 2017).

7 Zespołu Mariona-Simsa – pochwica (łac. *vaginismus*), dysfunkcja seksualna uniemożliwiająca odbycie stosunku. Jej przyczyną jest mimowolne obkurczanie mięśni pochwy.

Finansowanie

Badania finansowane przez Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie (nr badań: WNoZ-322-01/S/19/2021).

Piśmiennictwo

Agarwal A., Barbăroșie C., Ambar R., Finelli R.: The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. Int J Mol Sci. 2020, 21(11), 3882. DOI: 10.3390/ijms21113882. PMID: 32485940.

Aitken R.J.: Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. Mol Reprod Dev. 2017, 84(10), 1039–1052. DOI: 10.1002/mrd.22871. PMID: 28749007.

Ambar R.F., Agarwal A., Majzoub A., Vij S., Tadros N.N., Cho C.L. i wsp.: The Use of Testicular Sperm for Intracytoplasmic Sperm Injection in Patients with High Sperm DNA Damage: A Systematic Review. World J Mens Health. 2020. DOI: 10.5534/wjmh.200084. PMID: 32648379.

Anifandis G., Bounartzi T., Messini C.I., Dafopoulos K., Markandona R., Sotiriou S. i wsp.: Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments. Andrologia. 2015, 47(3), 295–302. DOI: 10.1111/and.12259. PMID: 24621442.

Antonouli S., Papatheodorou A., Panagiotidis Y., Petousis S., Prapas N., Nottola S.A. i wsp.: The impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome in cases of donated oocytes. Arch Gynecol Obstet. 2019, 300(1), 207–215. DOI: 10.1007/s00404-019-05133-9. PMID: 30941554.

Avendaño C., Franchi A., Duran H., Oehninger S.: DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. Fertil Steril. 2010, 94(2), 549–557. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.050. PMID: 19339003.

Bączkowski T., Kurzawa R., Głabowski W.: Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. Reprod Biol. 2004, 4(1), 5–22. PMID: 15094792.

Benagiano G., Paoli D., Lombardo F., Brosens J.J., Brosens I.A.: DNA fragmentation and the ultimate success of a pregnancy. Transl Androl Urol. 2017, 6(Suppl 4), 539–543. DOI: 10.21037/tau.2017.03.46. PMID: 29082175.

Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Lejeune H. i wsp.: Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod. 2003, 18(5), 1023–1028. DOI: 10.1093/humrep/deg228. PMID: 12721180.

Bichara C., Berby B., Rives A., Jumeau F., Letailleur M., Setif V. i wsp.: Sperm chromatin condensation defects, but neither DNA fragmentation nor aneuploidy, are an independent predictor of clinical pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet. 2019, 36(7), 1387–1399. DOI: 10.1007/s10815-019-01471-4. PMID: 31289980.

Borges E. Jr., Zanetti B.F., Setti A.S., Braga D.P., Provenza R.R., Iaconelli A. Jr.: Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. Fertil Steril. 2019, 112(3), 483–490. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.029. PMID: 31200969.

Borini A., Tarozzi N., Bizzaro D., Bonu M.A., Fava L., Flamigni C. i wsp.: Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. Hum Reprod. 2006, 21(11), 2876–2781. DOI: 10.1093/humrep/del251. PMID: 16793992.

Bounartzi T., Dafopoulos K., Anifandis G., Messini C.I., Koutsonikou C., Kouris S. i wsp.: Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients. Hum Fertil (Camb). 2016, 19(1), 56–62. DOI: 10.3109/14647273.2016.1157629. PMID: 27006263.

Bungum M., Bungum L., Giwercman A.: Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. Asian J Androl. 2011, 13(1), 69–75. DOI: 10.1038/aja.2010.73. PMID: 21057512.

Chen L., Fang J., Jiang W., Wang J., Li D.: Effects of the sperm DNA fragmentation index on the clinical and neonatal outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. J Ovarian Res. 2020, 13(1), 52. DOI: 10.1186/s13048-020-00658-z. PMID: 32359369.

Cho C.L., Agarwal A.: Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. Arab J Urol. 2017, 16(1), 21–34. DOI: 10.1016/j.aju.2017.11.002. PMID: 29713533.

Daris B., Goropevsek A., Hojnik N., Vlaisavljević V.: Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. Arch Gynecol Obstet. 2010, 281(2), 363–367. DOI: 10.1007/s00404-009-1140-y. PMID: 19504115.

Drenth Olivares M., Kuiper D.B., Haadsma M.L., Heineman K.R., Heineman M.J., Hadders-Algra M.: IVF procedures are not, but subfertility is associated with neurological condition of 9-year-old offspring. Early Hum Dev. 2019, 129, 38–44. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2018.12.017. PMID: 30639464.

ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine: The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. Reprod Biomed Online. 2017, 35(5), 494–510. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.06.015. PMID: 28784335.

Esteves S.C.: Interventions to Prevent Sperm DNA Damage Effects on Reproduction. Adv Exp Med Biol. 2019, 1166, 119–148. DOI: 10.1007/978-3-030-21664-1_8. PMID: 31301050.

Esteves S.C.: Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives. J Assist Reprod Genet. 2016, 33(10), 1319–1335. DOI: 10.1007/s10815-016-0763-8. PMID: 27423664.

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(Suppl 4), 495–500. DOI: 10.21037/tau.2017.07.20. PMID: 29082168.

Evgeni E., Lymberopoulos G., Touloupidis S., Asimakopoulos B.: Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. Andrologia. 2015, 47(10), 1166–1174. DOI: 10.1111/and.12398. PMID: 25586471.

Fishel S., Campbell A., Foad F., Davies L., Best L., Davis N. i wsp.: Evolution of embryo selection for IVF from subjective morphology assessment to objective time-lapse algorithms improves chance of live birth. Reprod Biomed Online. 2020, 40(1), 61–70. DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.10.005. PMID: 31831370.

Gardner D.K, Lane M., Stevens J., Schlenker T., Schoolcraft W.B.: Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril. 2000, 73(6), 1155–1158. DOI: 10.1016/s0015-0282(00)00518-5.

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., Piasecka M.: Znaczenie oceny statusu chromatyny plemników ludzkich w warunkach naturalnego poczęcia. Post Androl. 2020, 7(1), 30–43. DOI: 10.26404/PAO_2353-8791.2020.03.

Gill K., Rosiak A., Gaczarzewicz D., Jakubik J., Kurzawa R., Kazienko A. i wsp.: The effect of human sperm chromatin maturity on ICSI outcomes. Hum Cell. 2018, 31(3), 220–231. DOI: 10.1007/s13577-018-0203-4. PMID: 29594950.

Gill K., Rosiak-Gill A., Jakubik J., Patorski L., Lukaszuk M., Piasecka M.: The higher risk for sperm DNA damage in infertile men. Ginekol Pol. 2019b, 90(12), 684–691. DOI: 10.5603/GP.2019.0117. PMID: 31909460.

Green K.A., Patounakis G., Dougherty M.P., Werner M.D., Scott R.T. Jr., Franasiak J.M.: Sperm DNA fragmentation on the day of fertilization is not associated with embryologic or clinical outcomes after IVF/ICSI. J Assist Reprod Genet. 2020, 37(1), 71–76. DOI: 10.1007/s10815-019-01632-5. PMID: 31755002.

Halvaei I., Litzky J., Esfandiari N.: Advanced paternal age: effects on sperm parameters, assisted reproduction outcomes and offspring health. Reprod Biol Endocrinol. 2020, 18(1), 110. DOI: 10.1186/s12958-020-00668-y. PMID: 33183337.

Hammadeh M.E., al-Hasani S., Stieber M., Rosenbaum P., Küpker D., Diedrich K.: The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. Hum Reprod. 1996, 11(11), 2468–2471. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019139. PMID: 8981135.

Hammadeh M.E., Stieber M., Haidl G., Schmidt W.: Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. Andrologia. 1998, 30(1), 29–35. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1998.tb01379.x. PMID: 9567167.

Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M., Stalf T., Hoogendijk C., Mehnert C. i wsp.: DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. Reprod Biomed Online. 2003, 7(4), 477–484. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61893-7. PMID: 14656411.

Homa S.T., Vassiliou A.M., Stone J., Killeen A.P., Dawkins A., Xie J. i wsp.: A Comparison Between Two Assays for Measuring Seminal Oxidative Stress and their Relationship with Sperm DNA Fragmentation and Semen Parameters. Genes (Basel). 2019, 10(3), 236. DOI: 10.3390/genes10030236. PMID: 30893955.

Iranpour F.G.: Impact of sperm chromatin evaluation on fertilization rate in intracytoplasmic sperm injection. Adv Biomed Res. 2014, 3, 229. DOI: 10.4103/2277-9175.145719. PMID: 25538915.

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.

Jauniaux E., Moffett A., Burton G.J.: Placental Implantation Disorders. Obstet Gynecol Clin North Am. 2020, 47(1), 117–132. DOI: 10.1016/j.ogc.2019.10.002. PMID: 32008663.

Jerre E., Bungum M., Evenson D., Giwercman A.: Sperm chromatin structure assay high DNA stainability sperm as a marker of early miscarriage after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2019, 112(1), 46–53.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.013. PMID: 31043234.

Jin J., Pan C., Fei Q., Ni W., Yang X., Zhang L. i wsp.: Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves. Fertil Steril. 2015, 103(4), 910–916. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.014. PMID: 25747135.

Kirkman-Brown J.C., De Jonge C.: Sperm DNA fragmentation in miscarriage – a promising diagnostic, or a test too far? Reprod Biomed Online. 2017, 34(1), 3–4. DOI: 10.1016/j.rbmo.2016.12.002. PMID: 28063527.

Kovacic B., Vlaisavljevic V., Reljic M., Cizek-Sajko M.: Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. Reprod Biomed Online. 2004, 8(6), 687–694. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61650-1. PMID: 15169587.

Krausz C., Cioppi F., Riera-Escamilla A.: Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact. Expert Rev Mol Diagn. 2018, 331–346. DOI: 10.1080/14737159.2018.1453358. PMID: 29540081.

Larson-Cook K.L., Brannian J.D., Hansen K.A., Kasperson K.M., Aamold E.T., Evenson D.P.: Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril. 2003, 80(4), 895–902. DOI: 10.1016/s0015-0282(03)01116-6. PMID: 14556809.

Lin M.H., Kuo-Kuang Lee R., Li S.H., Lu C.H., Sun F.J., Hwu Y.M.: Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates.

Fertil Steril. 2008, 90(2), 352–359. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.018. PMID: 17904130.

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.

Lu J.C., Jing J., Chen L., Ge Y.F., Feng R.X., Liang Y.J. i wsp.: Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China. Reprod Biol Endocrinol. 2018, 16(1), 23. DOI: 10.1186/s12958-018-0345-y. PMID: 29540184.

Łukszuk K., Kozioł K., Jakiel G., Jakimiuk A., Jędrzejczak P., Kuczyński W. i wsp.: Diagnostyka i leczenie niepłodności – rekomendacje Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRiE) oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników (PTGP). Ginekol Perinatol Prakt. 2018, 3(3), 112–140.

Majzoub A., Agarwal A., Esteves S.C.: Clinical utility of sperm DNA damage in male infertility. Panminerva Med. 2019, 61(2), 118–127. DOI: 10.23736/S0031-0808.18.03530-9. PMID: 30990284.

Marchlewska K., Gill K., Piasecka M.: Dodatkowa diagnostyka związana z nasieniem. W: Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii. Red. J. Hilczer-Słowikowska. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa, 2021, 349–376.

Montjean D., Zini A., Ravel C., Belloc S., Dalleac A., Copin H. i wsp.: Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. Andrology. 2015, 3(2), 235–240. DOI: 10.1111/andr.12001. PMID: 25755112.

Muriel L., Garrido N., Fernández J.L., Remohí J., Pellicer A., de los Santos M.J. i wsp.: Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2006, 85(2), 371–383. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.07.1327. PMID: 16595214.

Nasiri N., Eftekhari-Yazdi P.: An overview of the available methods for morphological scoring of pre-implantation embryos in in vitro fertilization. Cell J. 2015, 16(4), 392–405. DOI: 10.22074/cellj.2015.486. PMID: 25685730.

Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Mardani M.: Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet. 2001, 18(4), 219–225. DOI: 10.1023/a:1009412130417. PMID: 11432114.

Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Mozdarani H., Mardani M., Azvagi H.: Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia. 2004, 36(3), 95–100. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2004.00612.x. PMID: 15206907.

Nasr-Esfahani M.H., Salehi M., Razavi S., Anjomshoa M., Rozbahani S., Moulavi F.: Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online. 2005, 11(2), 198–205. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60959-5. PMID: 16168218.

Niu Z.H., Shi H.J., Zhang H.Q., Zhang A.J., Sun Y.J., Feng Y.: Sperm chromatin structure assay results after swim-up are related only to embryo quality but not to fertilization and pregnancy rates following IVF. Asian J Androl. 2011, 13(6), 862–866. DOI: 10.1038/aja.2011.77. PMID: 21841807.

Oleszczuk K., Giwercman A., Bungum M.: Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. Andrology. 2016, 4(2), 290–296. DOI: 10.1111/andr.12153. PMID: 26757265.

Parrella A., Keating D., Cheung S., Xie P., Stewart J.D., Rosenwaks Z.: A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. J Assist Reprod Genet. 2019, 36(10), 2057–2066. DOI: 10.1007/s10815-019-01543-5. PMID: 31418108.

Piasecka M., Gill K.: Zapłodnienie i pierwsze etapy rozwoju zarodka. W: Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii. Red. J. Hilczer-Słowikowska. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2021, 261–310.

Piasecka M., Gill K., Walczak-Jędrzejowska R.: Wybrane zaburzenia strukturalno-funkcjonalne plemników. W: Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii. Red. J. Hilczer-Słowikowska. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2021, 613–638.

Pregl Breznik B., Kovačič B., Vlaisavljević V.: Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? Fertil Steril. 2013, 99(5), 1233–1341. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.048. PMID: 23290739.

Razavi S., Nasr-Esfahani M.H., Mardani M., Mafi A., Moghdam A.: Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia. 2003, 35(4), 238–243. DOI: 10.1046/j.1439-0272.2003.00566.x. PMID: 12950409.

Rogenhofer N., Ott J., Pilatz A., Wolf J., Thaler C.J., Windischbauer L. i wsp.: Unexplained recurrent miscarriages are associated with an aberrant sperm protamine mRNA content. Hum Reprod. 2017, 32(8), 1574–1582. DOI: 10.1093/humrep/dex224. PMID: 28854581.

Sadeghi M.R., Hodjat M., Lakpour N., Arefi S., Amirjannati N., Modarresi T. i wsp.: Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. Avicenna J Med Biotechnol. 2009, 1(3), 173–180. PMID: 23408716.

Sadeghi M.R., Lakpour N., Heidari-Vala H., Hodjat M., Amirjannati N., Hossaini Jadda H. i wsp.: Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. Rom J Morphol Embryol. 2011, 52(2), 645–651. PMID: 21655656.

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–s1605. DOI: 10.1016/s0015-0282(03)00337-6. PMID: 12801566.

Sigalos G.A., Triantafyllidou O., Vlahos N.F.: Novel embryo selection techniques to increase embryo implantation in IVF attempts. Arch Gynecol Obstet. 2016, 294(6), 1117–1124. DOI: 10.1007/s00404-016-4196-5. PMID: 27628754.

Simon L., Brunborg G., Stevenson M., Lutton D., McManus J., Lewis S.E.: Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. Hum Reprod. 2010, 25(7), 1594–1608. DOI: 10.1093/humrep/deq103. PMID: 20447937.

Simon L., Lewis S.E.: Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? Syst Biol Reprod Med. 2011, 57(3), 133–138. DOI: 10.3109/19396368.2011.553984. PMID: 21299480.

Simon L., Lutton D., McManus J., Lewis S.E.: Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. Fertil Steril. 2011, 95(2), 652–627. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.019. PMID: 20864101.

Simon L., Murphy K., Shamsi M.B., Liu L., Emery B., Aston K.I. i wsp.: Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. Hum Reprod. 2014, 29(11), 2402–2412. DOI: 10.1093/humrep/deu228. PMID: 25205757.

Sivanarayana T., Ravi Krishna C., Jaya Prakash G., Krishna K.M., Madan K., Sudhakar G. i wsp.: Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. Reprod Med Biol. 2013, 13(2), 87–94. DOI: 10.1007/s12522-013-0168-7. PMID: 29699153.

Spector L.G., Brown M.B., Wantman E., Letterie G.S., Toner J.P., Doody K. i wsp.: Association of In vitro Fertilization With Childhood Cancer in the United States. JAMA Pediatr. 2019, 173(6):e190392. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2019.0392. PMID: 30933244.

Sun T.C., Zhang Y., Li H.T., Liu X.M., Yi D.X., Tian L. i wsp.: Sperm DNA fragmentation index, as measured by sperm chromatin dispersion, might not predict assisted reproductive outcome. Taiwan J Obstet Gynecol. 2018, 57(4), 493–498. DOI: 10.1016/j.tjog.2018.06.003. PMID: 30122567.

Tandara M., Bajić A., Tandara L., Bilić-Zulle L., Šunj M., Kozina V. i wsp.: Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. Andrology. 2014, 2(5), 678–686. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2014.00234.x. PMID: 24947544.

Tang L., Rao M., Yang W., Yao Y., Luo Q., Lu L. i wsp.: Predictive value of the sperm DNA fragmentation index for low or failed IVF fertilization in men with mild-to-moderate asthenozoospermia. J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2020, 10, 101868. DOI: 10.1016/j.jogoh.2020.101868. PMID: 32663655.

Tavalaee M., Razavi S., Nasr-Esfahani M.H.: Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril. 2009, 91(4), 1119–1126. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.063. PMID: 18504041.

Taylor T.H., Gitlin S.A., Patrick J.L., Crain J.L., Wilson J.M., Griffin D.K.: The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaICSIm in humans. Hum Reprod Update. 2014, 20(4), 571–581. DOI: 10.1093/humupd/dmu016. PMID: 24667481.

Tesarik J., Galán-Lázaro M.: Clinical scenarios of unexplained sperm DNA fragmentation and their management. Transl Androl Urol. 2017, 6(Suppl 4), 566–569. DOI: 10.21037/tau.2017.03.70. PMID: 29082179.

Velez de la Calle J.F., Muller A., Walschaerts M., Clavere J.L., Jimenez C., Wittemer C. i wsp.: Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. Fertil Steril. 2008, 90(5), 1792–1799. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.021. PMID: 18166175.

Ventura-Juncá P., Irarrázaval I., Rolle A.J., Gutiérrez J.I., Moreno R.D., Santos M.J.: In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. Biol Res. 2015, 48, 68. DOI: 10.1186/s40659-015-0059-y. PMID: 26683055.

Wang M., Sun J., Wang L., Gao X., Lu X., Wu Z. i wsp.: Assessment of density gradient centrifugation (DGC) and sperm chromatin dispersion (SCD) measurements in couples with male factor infertility undergoing ICSI. J Assist Reprod Genet. 2014, 31(12), 1655–1663. DOI: 10.1007/s10815-014-0339-4. PMID: 25227693.

Watanabe H.: Risk of chromosomal aberration in spermatozoa during intracytoplasmic sperm injection. J Reprod Dev. 2018, 12, 64(5), 371–376. DOI: 10.1262/jrd.2018-040. PMID: 29984741.

Wdowiak A., Bakalczuk S., Bakalczuk G.: The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmatic sperm injection. Reprod Biol. 2015, 15(2), 94–100. DOI: 10.1016/j.repbio.2015.03.003. PMID: 26051457.

Xue L.T., Wang R.X., He B., Mo W.Y., Huang L., Wang S.K. i wsp.: Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. J Int Med Res. 2016, 44(6), 1283–1291. DOI: 10.1177/0300060516664240. PMID: 28322098.

Yang H., Li G., Jin H., Guo Y., Sun Y.: The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. Transl Androl Urol. 2019, 8(4), 356–365. DOI: 10.21037/tau.2019.06.22. PMID: 31555559.

Zheng W.W., Song G., Wang Q.L., Liu S.W., Zhu X.L., Deng S.M. i wsp.: Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. Asian J Androl. 2018, 20(1), 75–79. DOI: 10.4103/aja.aja_19_17. PMID: 28675153.

Zini A., Meriano J., Kader K., Jarvi K., Laskin C.A., Cadesky K.: Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. Hum Reprod. 2005, 20(12), 3476–3480. DOI: 10.1093/humrep/dei266. PMID: 16123087.