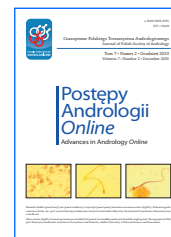




Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego

Postępy Andrologii Online

Advances in Andrology Online

<http://www.postepyandrologii.pl>

UDZIAŁ CZYNNIKA MĘSKIEGO W PORONIENIACH NAWRACAJĄCYCH MALE FACTOR AND RECURRENT PREGNANCY LOSS

Tomasz Machałowski ^{1,2†}, Kamil Gill ^{1†}, Małgorzata Piasecka ^{1†*}¹Zakład Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, ²Klinika Perinatologii, Położnictwa i Ginekologii SPSK1, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie[†]Wszyscy autorzy mają równy wkład w powstawanie pracy / All authors equally contributed to this study

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

tel. 91 48 00 907, e-mail: malgorzata.piasecka@pum.edu.pl

Otrzymano/received: 01.12.2020 r. Zaakceptowano/accepted: 01.02.2021 r.

DOI: [10.26404/PAO_2353-8791.2020.05](https://doi.org/10.26404/PAO_2353-8791.2020.05)

Tomasz Machałowski – lekarz rezydent, absolwent Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM). Autor i współautor artykułów naukowych w czasopismach polskich, zagranicznych i zjazdach naukowych. Od 2019 r. doktorant Szkoły Doktorskiej PUM w Szczecinie i rezydent w Klinice Perinatologii, Położnictwa i Ginekologii SPSK nr 1 PUM w Szczecinie. Członek Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników. Uczestnik wielu wymian naukowych w renomowanych Uniwersytetach, m.in. w Japonii, Niemczech i Tajlandii.

Tomasz Machałowski – MD, graduated from the Pomeranian Medical University in Szczecin (PUM). Author and co-author of articles in polish, foreign scientific journals and scientific meetings. Since 2019 PhD student at the Doctoral School of PUM in Szczecin and resident at the Department of Perinatology, Obstetrics and Gynecology, SPSK No. 1 PUM in Szczecin. Member of Polish Society of Gynecologists and Obstetricians. Participant of many scientific exchanges at prestigious universities, incl. in Japan, Germany and Thailand.

Streszczenie

W niniejszym artykule dokonano przeglądu piśmiennictwa związanego z udziałem czynnika męskiego w poronieniach, przede wszystkim nawracających. Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Rozrodu i Embriologii Człowieka z 2017 r. (ESHRE, ang. *European Society of Human Reproduction and Embryology*) za samoistne poronienia nawracające uznaje się co najmniej 2 następujące po sobie poronienia (utrata ciąży wewnątrzmacicznej) przed 24. tygodniem ciąży. Nie ulega wątpliwości, że rozszerzona diagnostyka, zwłaszcza molekularna, pozwoliła na zweryfikowanie nie tylko udziału czynnika żeńskiego w poronieniach, ale także męskiego, który niejednokrotnie był pomijany. Dlatego też większość prac klinicznych i opracowań w postaci metaanaliz danych dotyczy populacji żeńskiej. Jednak wielu autorów jako przyczynę poronień podaje: 1) liczbowe i strukturalne zaburzenia chromosomowe często związane



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>

z nieprawidłowościami spermatogenezy, 2) polimorfizmy genu *HLA-G* (ang. *human leukocyte antigen-G*), 3) allotypy antygenu *HLA-C* i związane z nimi haplotypy genów *KIR* (ang. *killer cell immunoglobulin-like receptors*), 4) mutacje i zmiany polimorficzne genów odpowiedzialnych za trombofilię, 5) mikrodelekcje i polimorfizmy chromosomu Y, 6) zaburzenia epigenetyczne, 7) strukturalne i funkcjonalne defekty plemników, ze szczególnym uwzględnieniem statusu ich chromatyny, 8) stres oksydacyjny w nasieniu oraz 9) zaawansowany wiek mężczyzny. Należy zwrócić uwagę, że prezentowane przez autorów wyniki często są niezgodne i niejednoznaczne, co powoduje potrzebę prowadzenia dalszych badań, również w celu opracowania odpowiednich i opartych na dowodach algorytmów diagnostyczno-terapeutycznych uwzględniających udział czynnika męskiego w poronieniach.

Słowa kluczowe: poronienia nawracające, niepłodność męska, aberracje chromosomowe, parametry seminologiczne, chromatyna plemnika, antygen *HLA-G*, receptory *KIR*, trombofilia, chromosom Y, stres oksydacyjny

Abstract

This article reviews the literature related to the participation of the male factor in miscarriages, mainly recurrent pregnancy loss. According to the 2017 guidelines of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), spontaneous recurrent miscarriages are defined as at least two or more pregnancy losses before 24 weeks of pregnancy. There is no doubt that extended diagnostics, especially molecular ones, made it possible to verify not only the share of the female factor in miscarriages, but also the male factor, which was often overlooked. Therefore, most of the research work and data meta-analysis concerns the female population. However, many authors give the cause of miscarriages: 1) numerical and structural chromosomal aberrations often associated with abnormal course of spermatogenesis, 2) polymorphisms of the *HLA-G* (human leukocyte antigen-G), 3) *HLA-C* allotypes and *KIR* haplotypes (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), 4) mutations and polymorphisms of genes responsible for thrombophilia, 5) microdeletions and polymorphisms of the Y chromosome, 6) epigenetics abnormalities, 7) structural and functional defects of spermatozoa, with particular emphasis on the status of their chromatin and 8) semen oxidative stress and 9) advanced paternal age. It should be noted that the results presented by the authors are often inconsistent and ambiguous, causing the need for further research, also in order to develop appropriate and evidence-based diagnostic and therapeutic algorithms take into account the participation of male factor in miscarriages.

Key words: recurrent pregnancy loss, male infertility, chromosomal aberrations, seminological parameters, sperm chromatin, *HLA-G* antigen, *KIR* receptors, thrombophilia, Y chromosome, oxidative stress

Skróty / Abbreviations

3'UTR – region nici DNA, na końcu 3', niepodlegający translacji (ang. *untranslated region*); APA – zaawansowany wiek ojcowski (ang. *advanced paternal age*); APC – komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells*); AUC – pole powierzchni pod krzywą (ang. *area under curve*); AZF – czynnik azoospermii (ang. *azoospermia factor*); bp – pary zasad (ang. *base-pair*); DFI – indeks fragmentacji DNA (ang. *DNA fragmentation index*); DMR – regiony DNA o zróżnicowanej metylacji (ang. *differentially methylated regions*); ESHRE – Europejskie Towarzystwo Rozrodu i Embriologii Człowieka (ang. *European Society of Human Reproduction and Embryology*); FGR – hipotrofia wewnątrzmaciczna (ang. *fetal growth restriction*); GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*); HLA – ludzkie antygeny leukocytarne (ang. *human leukocyte antigens*); *HLA-G* – ludzki leukocytny antygen G (ang. *human leukocyte antigen-G*); ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika (ang. *intracytoplasmic sperm injection*); *KIR* – immunoglobulinopodobne receptory komórek NK (ang. *killer cell immunoglobulin-like receptors*); MDA – dialdehyd malonowy (ang. *malonodialdehyde*); MHC – główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*); miRNA – mikro RNA (ang. *microRNA*); MTHFR – reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa (ang. *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*); PGT – diagnostyka przedimplantacyjna (ang. *preimplantation genetic testing*); RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*); ROC – krzywa ROC (ang. *receiver operating characteristic*); RPL – poronienia nawracające (ang. *recurrent pregnancy loss*); SCD – test dyspersji chromatyny plemników (ang. *sperm chromatin dispersion*); SCOS – zespołu samych komórek Sertolego (ang. *Sertoli cell-only syndrome*); SCSA – test służący do oceny uszkodzeń DNA (ang. *sperm chromatin structure assay*); SNP – polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphisms*); TESE – pozyskanie plemników z jądra (ang. *testicular sperm extraction*)

Termin „poronienie” zgodnie z rozporządzeniem ministra zdrowia i opieki społecznej z dnia 25 kwietnia 1994 r. (Dz.U. 1994 nr 56 poz. 234) określa się jako zakończenie ciąży wewnątrz macicznej trwającej krócej niż 22 tygodnie liczonej od terminu ostatniej miesiączki. Może wystąpić jednorazowo nawet u 15–25% kobiet <35. r.ż. i ryzyko to rośnie wraz z wiekiem kobiet do 50% >40. r.ż. U 1–2% kobiet rozpoznaje się poronienia

nawracające (RPL, ang. *recurrent pregnancy loss*) tradycyjnie definiowane jako 3 i więcej poronień następujących po sobie przed ukończeniem 24. tygodnia ciąży (Ford i Schust, 2009; Ibrahim i Johnstone, 2018; Pandey i Gupta, 2019; Regan i wsp., 2011). Obecnie według wytycznych Europejskiego Towarzystwa Rozrodu i Embriologii Człowieka (ESHRE, ang. *European Society of Human Reproduction and Embryology*) z 2017 r. poronienie

definiowane jest jako utrata ciąży wewnątrzmacicznej przed 24. tygodniem ciąży, a za samoistne poronienia nawracające uznaje się co najmniej 2 kolejno występujące po sobie poronienia przed 24. tygodniem ciąży (*Bender Atik i wsp., 2018; ESHRE, 2017*). Według tej definicji częstość poronień nawracających rośnie do 2–3%. Możemy je podzielić na pierwotne, kiedy żadna z wcześniejszych ciąż nie trwała dłużej niż 24 tygodnie i wtórne przy co najmniej 1. wcześniejszej ciąży trwającej dłużej niż 24 tygodnie. Obecny stan wiedzy pozwala zidentyfikować przyczynę nawracającej utraty ciąży u ok. 5–60% kobiet, której etiopatogeneza może być wieloczynnikowa. Tak duża rozbieżność diagnostyczna wynika z różnych kryteriów będących podstawą definicji poronień nawracających (*Bender Atik i wsp., 2018; Boogaard i wsp., 2013; ESHRE, 2017; El Hachem i wsp., 2017; Ford i Schust, 2009; Pandey i Gupta, 2019; Pfeifer i wsp., 2012; van Dijk i wsp., 2020; Youssef i wsp., 2020*).

Do niedawna brano pod uwagę jedynie udział czynnika żeńskiego w etiologii poronień. Dotyczy on m.in. nieprawidłowości anatomicznych, zaburzeń endokrynologicznych, immunologicznych i genetycznych. W niemal 50% RPL nie udaje się znaleźć przyczyny (RPL idiopatyczne), co niesie ze sobą psychiczne i fizyczne następstwa dla pary (*Bender Atik i wsp., 2018; Boogaard i wsp., 2013; El Hachem i wsp., 2017; ESHRE, 2017; Ibrahim i Johnstone, 2018; Pandey i Gupta, 2019; Pfeifer i wsp., 2012; van Dijk i wsp., 2020; Youssef i wsp., 2020*).

Obecnie coraz więcej badań dotyczy rozszerzonej diagnostyki czynnika męskiego, który może być przyczyną zaburzeń zapłodnienia, implantacji, poronień i wrodzonych deformacji (*Agarwal i wsp., 2016, 2019, 2020, 2021; Carlini i wsp., 2017; Esteves i wsp., 2021; Gil-Villa i wsp., 2010; Ibrahim i Johnstone, 2018; Kim i wsp., 2010; Mohanty i wsp., 2016; Sharma i wsp., 2015; Softness i wsp., 2020*). Liczbowe i strukturalne zaburzenia chromosomowe, polimorfizmy genu *HLA-G* (ang. *human leukocyte antigen-G*), allotypy antygeny *HLA-C* i związane z nimi haplotypy genów *KIR* (ang. *killer cell immunoglobulin-like receptors*), mutacje i zmiany polimorficzne genów odpowiedzialnych za trombofilię, mikrodelecje i polimorfizmy w obrębie długiego ramienia chromosomu Y, zaburzenia epigenetyczne, strukturalne i funkcjonalne defekty plemników, ze szczególnym uwzględnieniem statusu ich chromatyny, stres oksydacyjny w nasieniu oraz zaawansowany wiek mężczyzny – to jedne z najczęściej stwierdzanych bądź sugerowanych i dyskusowanych przyczyn mogących prowadzić do spontanicznych poronień, szczególnie nawracających (rycina 1). Należy jednak podkreślić, że wyniki badań nie zawsze są zgodne i jednoznaczne, na co zwrócono uwagę w niniejszym opracowaniu (*Agarwal i wsp., 2021; Alibakhshi i wsp., 2020; Barut i wsp., 2018; du Fossé i wsp., 2020; Monti i wsp., 2019; Pfeiffer i wsp., 2001; Piasecka i Gill, 2021; Udry i wsp., 2014; Wang i wsp., 2017; Youssef i wsp., 2020; Zhang i wsp., 2020*).

■ Zaburzenia chromosomowe

Jedną z najistotniejszych przyczyn poronień jest czynnik genetyczny, w tym zaburzenia chromosomowe. Wśród nich wyróżnia się aberracje liczbowe i strukturalne. Pierwsze z nich są efektem nieprawidłowego rozdziału chromosomów podczas podziału komórki (nondysjunkcja), drugie z kolei powstają na skutek delecji, inwersji, duplikacji albo translokacji fragmentu chromosomu. Zaburzenia genetyczne tworzą się *de novo* (przed zapłodnieniem podczas oogenezy lub spermatogenezy bądź podczas rozwoju zygoty/zarodka) lub są dziedziczone od rodziców. Powyższe nieprawidłowości prowadzić mogą nie tylko do poronień, ale także porodów przedwczesnych, hipotrofii wewnątrzmacicznej (FGR, ang. *fetal growth restriction*) oraz zespołów wad wrodzonych (embriopatii) (*Esquerré-Lamare i wsp., 2018; Kohn i wsp., 2016; Marquard i wsp., 2010; Page i Silver, 2016; Pal i wsp., 2018; Rabiega-Gmyrek i wsp., 2015; Rodrigo, 2019; Softness i wsp., 2020*).

Aberracje chromosomowe stwierdza się nawet u 70% samoistnie poronionych płodów (*Marquard i wsp., 2010; Rabiega-Gmyrek i wsp., 2015*). *Wang i wsp. (2020)* w ciążach poronionych wykazali 59,1% zaburzeń chromosomowych, wśród których przeważającą większość stanowiły przypadki aneuploidii (81,1%), następnie aberracje strukturalne chromosomów (6,4%), rzadziej identyfikowano mozaikowość chromosomową (2,3%). Do stwierdzanych aneuploidii należą: trisomia 21. pary chromosomów (zespół Downa), 18. pary (zespół Edwardsa), 16. pary, 13. pary (zespół Pataua) oraz monosomia chromosomu X (zespół Turnera) (*Kohn i wsp., 2016; Page i Silver, 2016; Pal i wsp., 2018; Rabiega-Gmyrek i wsp., 2015; Rodrigo, 2019*). Znaczący jest zarówno udział czynnika męskiego jak i żeńskiego. *Ramasamy i wsp., (2015a)* wykazał istotnie wyższe odsetki plemników z disomią chromosomu 13 i 21 (0,26% vs. 0,08%), 18 (0,18% vs. 0,03%) oraz płciowych (1,04% vs. 0,38%) wśród mężczyzn z par z RPL w porównaniu do mężczyzn płodnych z normozoospermia. Jedni badacze wykrywają nosicielstwo aberracji chromosomowych 2–4-krotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn z par z historią poronień (*Pal i wsp., 2018*), drudzy z kolei ujawniają porównywalną częstość zmian chromosomowych wśród kobiet (11%) i mężczyzn z niewielką przewagą wśród mężczyzn (11,8%) (*Alibakhshi i wsp., 2020*). Częstość ta wśród par z RPL jest różna w zależności od badanej populacji oraz liczby utraconych ciąż i wynosi 2–8% (vs. 0,3–0,4% lub 0,2–0,55% – generalna populacja), 9,88%, 11,5% lub 11,7% (*Alibakhshi i wsp., 2020; Fan i wsp., 2016; Ghazaey i wsp., 2015; Pal i wsp., 2018; Sheth i wsp., 2013*).

Alibakhshi i wsp. (2020) stwierdzili, że wśród anomalii chromosomowych weryfikowanych u par z RPL 13,95% stanowiły aberracje strukturalne, 0,78% nieprawidłowości liczbowe (jeden przypadek 47,XXY) i aż 85,27% warianty heteromorficzne chromosomów, dotyczące długości regionu heterochromatynowego, wielkości



Ryc. 1. Sugerowany udział czynnika męskiego w poronieniach nawracających (szczegóły w tekście)

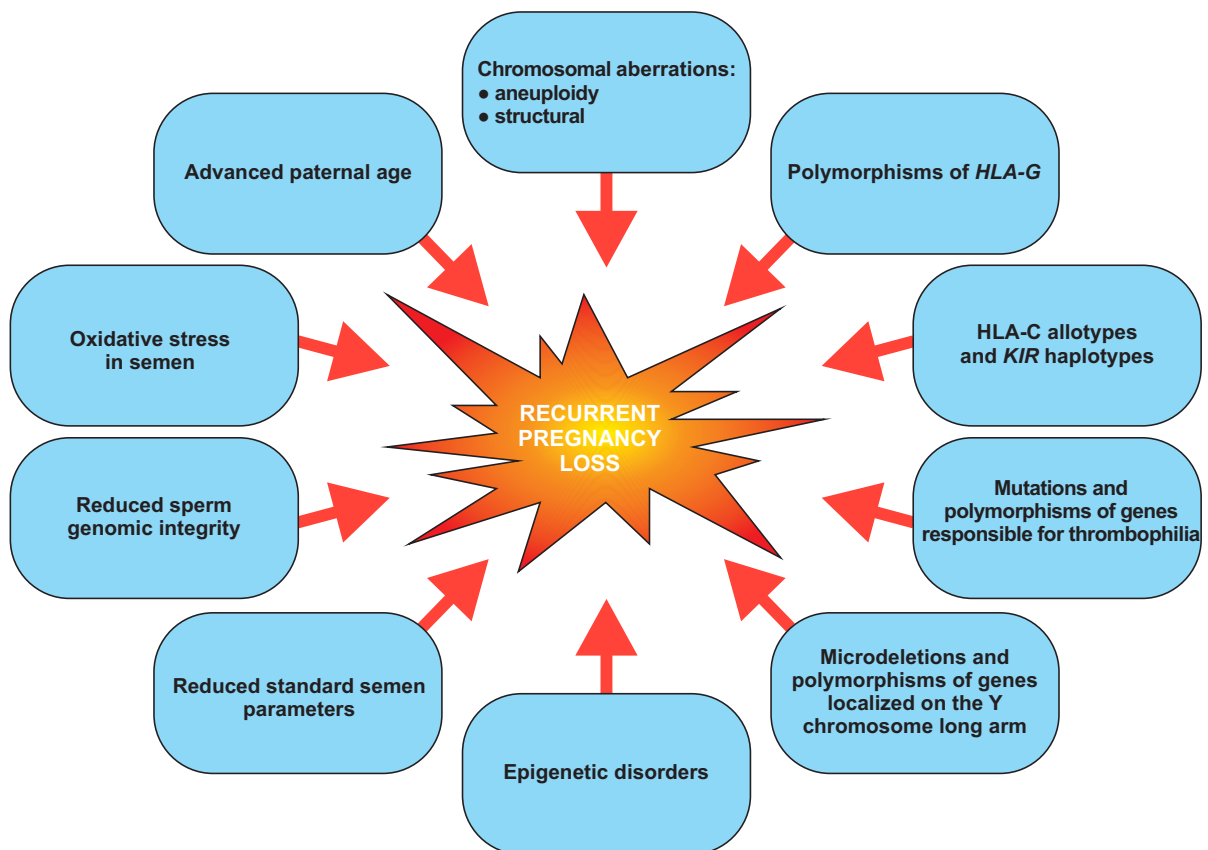


Fig. 1. Suggested male factor involved in recurrent pregnancy loss (details in the text)

satelitów oraz długości trzonu („stalk”) ramion krótkich chromosomów akrocentrycznych. W ramach aberracji strukturalnych chromosomów, ci sami autorzy ujawnili przypadki nosicielstwa zrównoważonych translokacji wzajemnych¹ (u 10 kobiet i 6 mężczyzn) oraz translokacji Robertsonowskich² (u 1 kobiety i 1 mężczyzny). Chromosomami zaangażowanymi w proces translokacji wzajemnej u mężczyzn były 1, 2, 4, 7, 9, 11 i 22 – 46,XY,t(1;7), 46,XY,t(4;7), 46,XY,t(2;9), 46,XY,t(4;6), 46,XY,t(11;22), z kolei w przypadku translokacji Robertsonowskiej chromosom 13 – 45,XY,der(13;13).

Inni autorzy także potwierdzili negatywny wpływ nosicielstwa translokacji chromosomowych na uzyskanie ciąży i jej donoszenie (Kar i wsp., 2018; Kohn i wsp., 2016; Page i Silver, 2016; Pal i wsp., 2018). W dwóch przypadkach translokacji Robertsonowskich 45,XY,der(14;21) (kobieta była nosicielem tej samej translokacji) i 45,XY,der(13;14) (kobieta miała prawidłowy kariotyp) wykonanie procedury ICSI (docyttoplazmatyczna iniekcja plemnika, ang. *intracytoplasmic sperm injection*) nie skutkowało ciążą kliniczną. Rekomendowana była procedura z wykorzystaniem dawcy nasienia. Z kolei w trzecim przypadku z potwierdzoną tą samą translokacją 45,XY,der(13;14) (kobieta miała prawidłowy kariotyp) po wykonaniu ICSI uzyskano ciążę, która skończyła się urodzeniem męskiego potomka z translokacją odziedziczoną po ojcu. We wszystkich opisanych przypadkach mężczyźni mieli ciężką oligoastenoteratozoospermiją (Kar i wsp., 2018). Należy podkreślić, że zaburzenia chromosomowe plemników, zarówno translokacje jak i aneuploidie zwykle wykazuje się u mężczyzn z nieprawidłowymi standardowymi parametrami seminologicznymi ze względu na poważne zaburzenia spermatogenezy (Almesned i wsp., 2020; Magli i wsp., 2020; Ramasamy i wsp., 2015b).

Na kliniczny indeks ciąż par objętych programem zapłodnienia *in vitro* korzystnie wpływa diagnostyka przedimplantacyjna (PGT, ang. *preimplantation genetic testing*), która zdecydowanie jest rekomendowana w przypadku stwierdzanych aberracji chromosomowych u partnerów i odnotowanych nawracających poronień. Nie można pominąć faktu, że niemal 60% zarodków uzyskanych od par z idiopatycznymi poronieniami nawracającymi w wywiadzie jest aneuploidalnych. Dzięki wykorzystaniu wyników PGT transfer zarodka euploidalnego pozwolił na zmniejszenie odsetka poronień z 23,7% na 6,9% lub zwiększenie odsetka żywych urodzeń z 4,9% do >80% (Alibakhshi i wsp., 2020; Almesned i wsp., 2020; Hodes-Wertz i wsp., 2012; Kar i wsp., 2018; Kohn i wsp.,

2016; Magli i wsp., 2020; Page i Silver, 2016; Rodrigo, 2019; Softness i wsp., 2020). Podsumowując, można stwierdzić, że za większość przyczyn idiopatycznych RPL mogą odpowiadać zaburzenia chromosomalne zarodka, będące efektem dziedziczenia bądź też mutacji *de novo*.

■ Polimorfizmy genu HLA-G

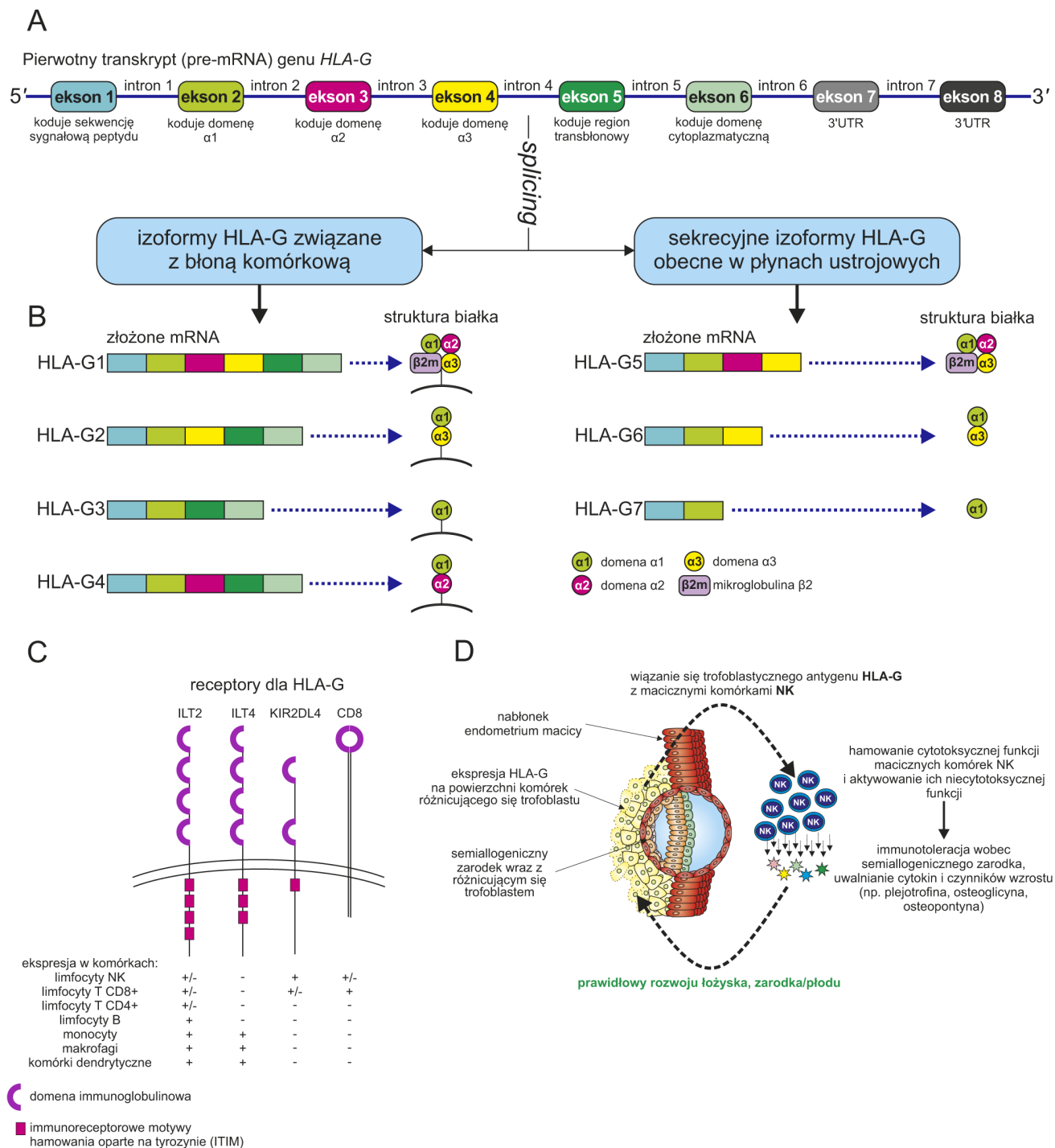
Główny układ zgodności tkankowej (MHC, ang. *major histocompatibility complex*) określany jest mianem ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA, ang. *human leukocyte antigens*). Białka je tworzące należą do istotnych makromolekuł zaangażowanych we wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Uczestniczą m.in. w przyjęciu lub odrzuceniu przeszczepu, reakcje alergiczne, procesy nowotworowe i zaburzenia autoimmunologiczne. W tym ostatnim przypadku antygeny HLA mogą być odpowiedzialne za zagnieżdżenie zarodka i utrzymanie ciąży. Geny MHC znajdują się na ramieniu krótkim chromosomu 6 (6p21.3). Wyróżnia się dwie klasy antygenów HLA, różniące się budową, udziałem w prezentacji antygenów oraz miejscem występowania. HLA klasy I (a, b, c) zlokalizowane są na wszystkich jądrzastych komórkach organizmu, a także na płytkach krwi i erytrocytach, natomiast HLA klasy II na komórkach prezentujących antygen (APC, ang. *antigen presenting cells*) (Aldrich i wsp., 2001; Dahl i Hviid, 2012; Deshmukh i Way, 2019; Hviid, 2015; Klimkiewicz-Wojciechowska i Lech-Marañda, 2012; Koc i wsp., 2018; Persson i wsp., 2017, 2020; Wiktorowicz i Kaszkowiak, 2018).

Gen kodujący białko HLA-G składa się z 8 egzonów i 7 intronów. W wyniku alternatywnego *splicingu* transkryptu HLA-G tworzone są białka będące izoformami antygeny HLA-G (HLA-G1–G7). Antygen HLA-G, podobnie jak HLA-E i HLA-F, jest nieklasyczną cząsteczką należącą do klasy Ib. Główna jego izoforma HLA-G1 jest transbłonową glikoproteiną zbudowaną z łańcucha lekkiego (β 2-mikroglobulina) oraz łańcucha ciężkiego zawierającego trzy domeny (α 1, α 2, α 3). Pozostałe izoformy HLA-G2–G4 związane są także z błoną komórkową, natomiast HLA-G5–G7 są antygenami sekrecyjnymi (sHLA-G) występującymi w płynach ustrojowych (rycina 2) (Attia i wsp., 2020; Carosella i wsp., 2008; Dahl i Hviid, 2012; Dahl i wsp., 2014a; Hviid, 2015; Klimkiewicz-Wojciechowska i Lech-Marañda, 2012; Lin i Yan, 2018; Persson i wsp., 2017, 2020). Jak wspomniano wcześniej, antygen HLA-G zaangażowany jest w proces implantacji zarodka i utrzymania ciąży. Wykrywa się go na powierzchni różnicującego się trofoblastu w początkowych tygodniach ciąży oraz na powierzchni powstałego z trofoblastu łożyska. Ponadto stwierdza się jego ekspresję w zapłodnionej komórce jajowej (rycina 2) (Andreotti i wsp., 2018; Hviid, 2015; Dahl i Hviid, 2012; Deshmukh i Way, 2019; Fu i wsp., 2017).

Uważa się, że HLA-G poprzez wiązanie się z receptorami zlokalizowanymi na komórkach immuno-

1 Translokacja wzajemna ma miejsce wtedy, gdy dochodzi do wymiany odcinków między chromosomami niehomologicznymi. Liczba chromosomów nie zmienia się. Chromosomy, pomiędzy którymi nastąpiła wymiana odcinków, mają zmienioną budowę. Wyróżnia się translokacje zrównoważone (brak utraty materiału genetycznego) i niezrównoważone (utrata materiału genetycznego)

2 Translokacja Robertsonowska ma miejsce wtedy, gdy dochodzi do łączenia się całych lub prawie całych ramion długich chromosomów akrocentrycznych. Długie ramiona łączą się na poziomie centromeru, z kolei krótkie ramiona są tracone. Liczba chromosomów zmniejsza się i wynosi 45.



Ryc. 2. Budowa pierwotnego transkryptu genu *HLA-G* (A), alternatywnych transkryptów i izoform białkowych HLA-G1–7 (B), receptorów dla antygeny HLA-G (C) oraz rola trofoblastycznego antygeny HLA-G w prawidłowym rozwoju łożyska, zarodka/płodu (D). 3'UTR – region mRNA występujący na końcu 3' niepodlegający translacji, ILT-2 – ludzki hamujący receptor immunoglobulinopodobny 2, ILT-4 – ludzki hamujący receptor immunoglobulinopodobny 4, KIR2DL4 – hamujący receptor 2DL4, NK – komórki naturalnej cytotoxyczności (szczegóły w tekście)

kompetentnych uczestniczy w regulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Antygen ten, za pośrednictwem odpowiednich receptorów: 1) wpływa na aktywność macicznych (macicznych) komórek NK (ang. *natural killer*) – hamuje ich cytotoxyczne działanie i jednocześnie stymuluje je do uwalniania cytokin i czynników wzrostu, 2) wpływa na funkcję limfocytów T cytotoxycznych (CD8+) oraz 3) bierze udział w immunoregulacji komórek APC, limfocytów T

pomocniczych (CD4+) i T regulatorowych (Treg) (supresorowych). Zjawiska te prowadzą do tolerancji semiallogenicznego zarodka/płodu przez maciczny układ odpornościowy, co niewątpliwie ma kluczowe znaczenie dla utrzymania ciąży (rycina 2) (*Andreotti i wsp., 2018; Attia i wsp., 2020; Craenmehr i wsp., 2019b; Dahl i Hviid, 2012; Deshmukh i Way, 2019; Fu i wsp., 2017; Havrylyuk i wsp., 2015; Hviid, 2015; Nilsson i wsp., 2014; Persson i wsp., 2017, 2020*).

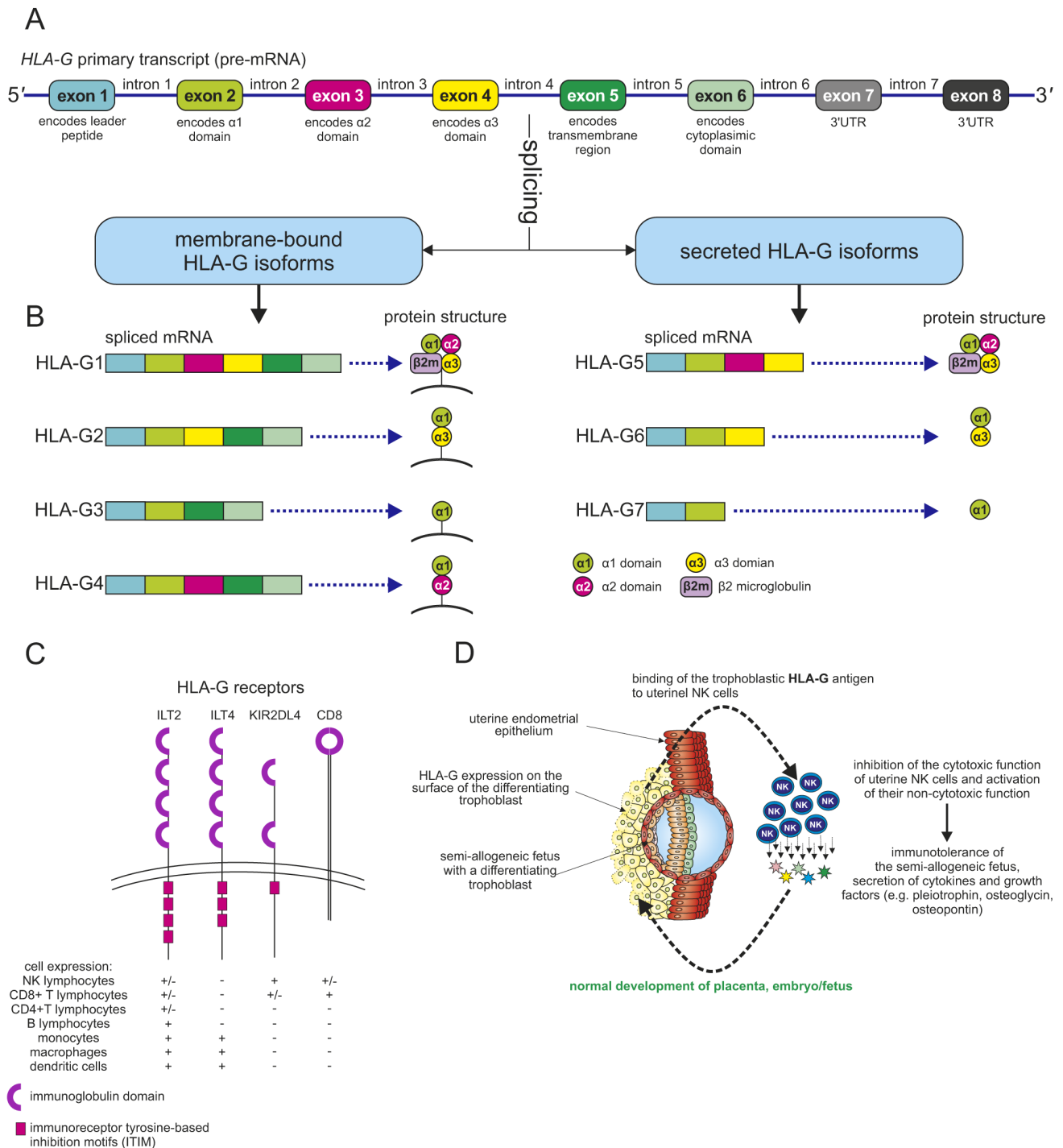


Fig. 2. HLA-G primary transcript (A), alternative transcripts and HLA-G1-7 protein isoforms (B), HLA-G receptors (C) and role of trophoblastic HLA-G antigen in normal development of placenta, embryo/fetus (D). 3'UTR – 3' untranslated region of mRNA, ILT-2 – human inhibitory receptors immunoglobulin-like transcript 2, ILT-4 – human inhibitory receptors immunoglobulin-like transcript 4, KIR2DL4 – immunoglobulin-like receptor 2DL4, NK – natural killer cells (details in the text)

Wykazano, że zmniejszona ekspresja antygenu HLA-G występuje w przypadku RPL oraz stanie przedrzucawkowym, co potwierdza jego ochronne działanie na ciążę (Nilsson i wsp., 2014; Persson i wsp., 2017, 2020; Wiktorowicz i Kaszkowiak, 2018; Yazdani i wsp., 2018). Opinie jednak co do klinicznego znaczenia HLA-G w przypadku poronień nie zawsze są zgodne i oczywiste, co podkreślił Dahl i wsp. (2014a). Z kolei, Eskicioğlu i wsp. (2016) wykazali większą ekspresję antygenu HLA-G w grupie

kobiet płodnych w odniesieniu do kobiet z poronieniami w wywiadzie, ale różnica ta nie była statystycznie istotna.

W układzie płciowym męskim ekspresję antygenu HLA-G wykrywa się w gonadzie, w tym w komórkach Sertolego, co jest zrozumiałe, komórki te bowiem m.in. uczestniczą w immunomodulacji na terenie gonady. Haploidalne komórki germinalne zlokalizowane w części adluminalnej kanalik nasennego jako komórki antygenowo obce nie mogą być rozpoznawane przez układ

immunologiczny. Ponadto ekspresję HLA-G wykazano w kanalikach odprowadzających jądra (łac. *ductuli efferentes*), najądrzu, prostatie i plazmie nasiennej, w której występuje rozpuszczalna izoforma tego antygenu – sHLA-G (Dahl i Hviid, 2012; Dahl i wsp., 2014a; 2014b; Hviid, 2015; Nederlof i wsp., 2017; Schallmoser i wsp., 2019).

Plazma deponowana w żeńskich drogach rodnych, wraz z ich wydzieliną, uczestniczy w immunomodulacji, plemniki bowiem jako komórki allogeniczne mogą być rozpoznawane przez układ immunologiczny kobiety i inicjować odpowiedź immunologiczną. Zawiera ona m.in. cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu, silne modulatory dla mieloidalnych komórek prezentujących antygen i rozwoju limfocytów. Warto zaznaczyć, że obecny w nasieniu transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor* β), inicjujący produkcję czynnika hemopoetycznego odpowiedzialnego za powstanie granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*), wraz z prostaglandyną E2 uczestniczy w promowaniu tolerancji immunologicznej, np. w rekrutacji matczynych limfocytów Treg (Deshmukh i Way, 2019; Hviid, 2015; Szczykutowicz i wsp., 2019). Istotną rolę w tych procesach może odgrywać sHLA-G, który uczestniczy w immunosupresji. Można przypuszczać, że zmiany w ekspresji tego antygenu mogą doprowadzić do rozpoznania ojcowskich antygenów przed osiągnięciem ciąży bądź zmniejszać immunotolerancję na semiallogeniczny zarodek, co prawdopodobnie może obniżać szansę na zapłodnienie, prawidłową implantację i utrzymanie ciąży (Dahl i Hviid, 2012; Dahl i wsp., 2014a; 2014b; Hviid, 2015; Nederlof i wsp., 2017). Istnieją jednak doniesienia, w których nie wykazuje się powiązań między poziomem sHLA-G w plazmie nasienia a jego jakością (Nilsson i wsp., 2020; Schallmoser i wsp., 2019), poronieniami (Craenmehr i wsp., 2019a) bądź uzyskaniem ciąży (Schallmoser i wsp., 2019).

Większość autorów uznaje polimorfizmy genu HLA-G jako czynnik etiologiczny RPL. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że m.in. kliniczne znaczenie mają allele HLA-G*0104, HLA-G*0105N, HLA-G*01013 (Aldrich i wsp., 2001; Dahl i Hviid, 2012; Dahl i wsp., 2014a; Koc i wsp., 2018; Persson i wsp., 2020; Pfeiffer i wsp., 2001; Puscheck i Jeyendran, 2007). Aldrich i wsp. (2001) analizując genotypy u 113 par z historią niewyjaśnionych RPL (vs. pary płodne), po uwzględnieniu wieku matki, liczby wcześniejszych poronień i żywo urodzonych, stwierdzili zwiększone ryzyko (OR, ang. *odds ratio*) poronienia, jeśli którykolwiek z partnerów był nosicielem allele HLA-G*0104 lub HLA-G*0105N. Ryzyko to było ponad 3,5-krotnie wyższe w przypadku nosicielstwa (OR = 3,62). Z kolei trzeci z wymienionych allele HLA-G*01013 nie wykazywał asocjacji z poronieniami. Uważa się, że allele HLA-G*0104, HLA-G*0105N są odpowiedzialne za zmiany polimorficzne występujące w domenie $\alpha 2$ łańcucha ciężkiego antygenu HLA-G. Wyniki te częściowo były zgodne z wynikami Pfeiffer i wsp. (2001), którzy analizując częstość występowania allele HLA-G*0105N i HLA-G*01013

w grupie par z RPL (n = 78) i w grupie par płodnych (n = 52), stwierdzili statystycznie większą częstość występowania obu allele w pierwszej z wymienionych grup, zarówno wśród kobiet, jak i mężczyzn. W efekcie opisywanych zmian genetycznych powstaje niefunkcjonalna izoforma G1 antygenu – HLA-G1. Powyższe nieprawidłowości mogą stanowić nawet do 1/3 przyczyn poronień nawracających (Aldrich i wsp., 2001; Persson i wsp., 2017; 2020; Pfeiffer i wsp., 2001; Puscheck i Jeyendran, 2007).

Obok opisanych powyżej polimorfizmów na szczególną uwagę zasługują zmiany polimorficzne w regionie 3'UTR³ (ang. 3' *untranslated region*) genu HLA-G, które powodują zmiany w ekspresji/poziomie rozpuszczalnego antygenu sHLA-G stwierdzanego w płynach ustrojowych, w tym – jak wspomniano wcześniej – plazmie nasiennej (Craenmehr i wsp., 2019a; Dahl i Hviid, 2012; Dahl i wsp., 2014a; 2014b; Nilsson i wsp., 2020). Region 3' UTR jest miejscem docelowym dla cząsteczek mikro RNA (miRNA, ang. *microRNA*) uczestniczących w posttranskrypcyjnej regulacji. Polimorfizmy w tym regionie mogą mieć wpływ na stabilność wiązania miRNA, co w konsekwencji może zmniejszać/zwiększać ekspresję sHLA-G w zależności od haplotypu⁴ 3' UTR (Amodio i wsp., 2016; Craenmehr 2019a; Dahl i wsp., 2014a). Do najczęściej identyfikowanych zmian należą zmiany pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *single nucleotide polymorphisms*), G/C w pozycji +3142, A/G w pozycji +3187, C/T w pozycji +3035, C/G w pozycji +3010, C/G w pozycji +3196, G/T w pozycji +3509 oraz polimorfizm insercyjno-delecyjny (Ins/Del) 14 par zasad (bp, ang. *base-pair*) (Amodio i wsp., 2016; Craenmehr i wsp., 2019a; Dahl i Hviid, 2012; Dahl i wsp., 2014b; Fan i wsp., 2014, 2017; Hviid, 2015; Kalotra i wsp., 2018; Koc i wsp., 2018; Monti i wsp., 2019; Nilsson i wsp., 2014, 2018).

Uważa się, że zmiany polimorficzne 14 bp mogą być czynnikiem ryzyka poronień, co wykazało wielu autorów (Amodio i wsp., 2016; Dahl i Hviid, 2012; Fan i wsp., 2014, 2017; Koc i wsp., 2018; Nilsson i wsp., 2014; Monti i wsp., 2019). Amodio i wsp. (2016) stwierdzili powiązanie polimorfizmu +14 bp Ins ze zmniejszoną ekspresją HLA-G, z kolei polimorfizmu -14 bp Del ze zwiększoną ekspresją sHLA-G w grupie kobiet z RPL w wywiadzie (2 poronienia) w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak nie zawsze ujawnia się wpływ zmian polimorficznych 14 bp na wystąpienie poronień (Craenmehr i wsp., 2019a; Fan i wsp., 2017; Kalotra i wsp., 2018). Craenmehr i wsp. (2019a) nie stwierdzili różnic w częstości tych zmian identyfikowanych w genie kodującym antygen sHLA-G plazmy nasiennej u mężczyzn z par z historią RPL w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei Fan i wsp. (2017), przeprowadzając metanalizę opublikowanych danych, doszli do wniosku,

3 Region 3' UTR to region zlokalizowany na końcu 3'mRNA, nie kodujący struktury białka, dlatego też nie podlegający translacji (synteza białka), czyli przepisywaniu sekwencji nukleotydów na sekwencję aminokwasów.

4 Haplotyp to grupa sprzężonych polimorficznych allele, zlokalizowanych na tym samym chromosomie, w całości odziedziczona od jednego rodzica i przekazywana na następne pokolenie.

że związek między polimorfizmem 14 bp a poronieniami może być zależny od grupy etnicznej. Rasa kaukaska wykazuje zdecydowanie większe ryzyko wystąpienia poronienia niż populacja generalna (OR = 3,09).

Allotypy antygeny HLA-C i związane z nim receptory KIR

Antygen HLA-C jest klasycznym, wysoce polimorficznym antygenem należącym do klasy Ia. Jako jedyny antygen tej klasy wykazuje ekspresję na powierzchni komórek trofoblastu. Zgodnie z dostępną wiedzą jest dominującym ligandem dla receptorów KIR (ang. *killer cell immunoglobulin-like receptors*) zlokalizowanych na powierzchni komórek NK występujących w macicy. HLA-C wiąże się zarówno z receptorami hamującymi (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3) jak i aktywującymi (KIR2DS1, KIR2DS2), przez co ma miejsce modulacja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej związana z funkcją komórek NK. Antygen ten wchodząc w interakcję z receptorami KIR aktywującymi pośredniczy w niecytotoksycznej (nielitycznej) aktywacji macicznych komórek NK, co w konsekwencji prowadzi do wydzielania cytokin lub czynników wzrostu promujących rozwój łożyska i zarodka. Zatem silna aktywacja komórek NK przez HLA-C za pośrednictwem receptorów KIR aktywujących jest zjawiskiem niezbędnym i korzystnym dla prawidłowego przebiegu ciąży (rycina 3) (*Dahl i Hviid, 2012; Havrylyuk i wsp., 2015; Hviid, 2015; Moffett i Hiby, 2007; Papúchová i wsp., 2019; Würfel i wsp., 2019; Yang i wsp., 2020*).

Wyróżnia się dwa allotypy cząsteczki HLA-C w zależności od jej wiązania się z receptorami KIR. Allotyp HLA-C1 (asparagina w pozycji 80 domeny $\alpha 1$) wchodzi w interakcję z hamującymi receptorami KIR2DL2, KIR2DL3 i aktywującym KIR2DS2, natomiast HLA-C2 (lizyna w pozycji 80 domeny $\alpha 1$) z hamującym KIR2DL1 i aktywującym KIR2DS1 (rycina 3). Allotyp HLA-C2 wiąże się z większą aktywacją receptorów hamujących. Genotyp HLA-C komórek trofoblastu w połowie określony jest przez odziedziczony allotyp od ojca i w połowie od matki. Zatem genotyp HLA-C trofoblastu może być następujący: C1C1 (homozygota), C2C2 (homozygota), C1C2 (heterozygota). Wyróżnia się także dwa haplotypy genów kodujących receptory KIR komórek NK w zależności od dominującego występowania aktywujących lub hamujących receptorów. W haplocie A dominują receptory hamujące, z kolei w B aktywujące. Matczyne genotypy KIR to AA (brak aktywujących receptorów KIR), BB lub AB (obecność od 1 do 5 aktywujących receptorów KIR). Największe ryzyko powikłań łożyskowych (stan przedrzucawkowy, poronienia) ma miejsce w przypadku matczyne genotypu AA i płodowego genotypu C2C2, ponieważ brak jest prawidłowej aktywacji niecytotoksycznej działalności matczynek komórek NK (rycina 3) (*Dahl i Hviid, 2012; Havrylyuk i wsp., 2015; Hviid, 2015; Moffett i Hiby, 2007; Würfel i wsp., 2019*).

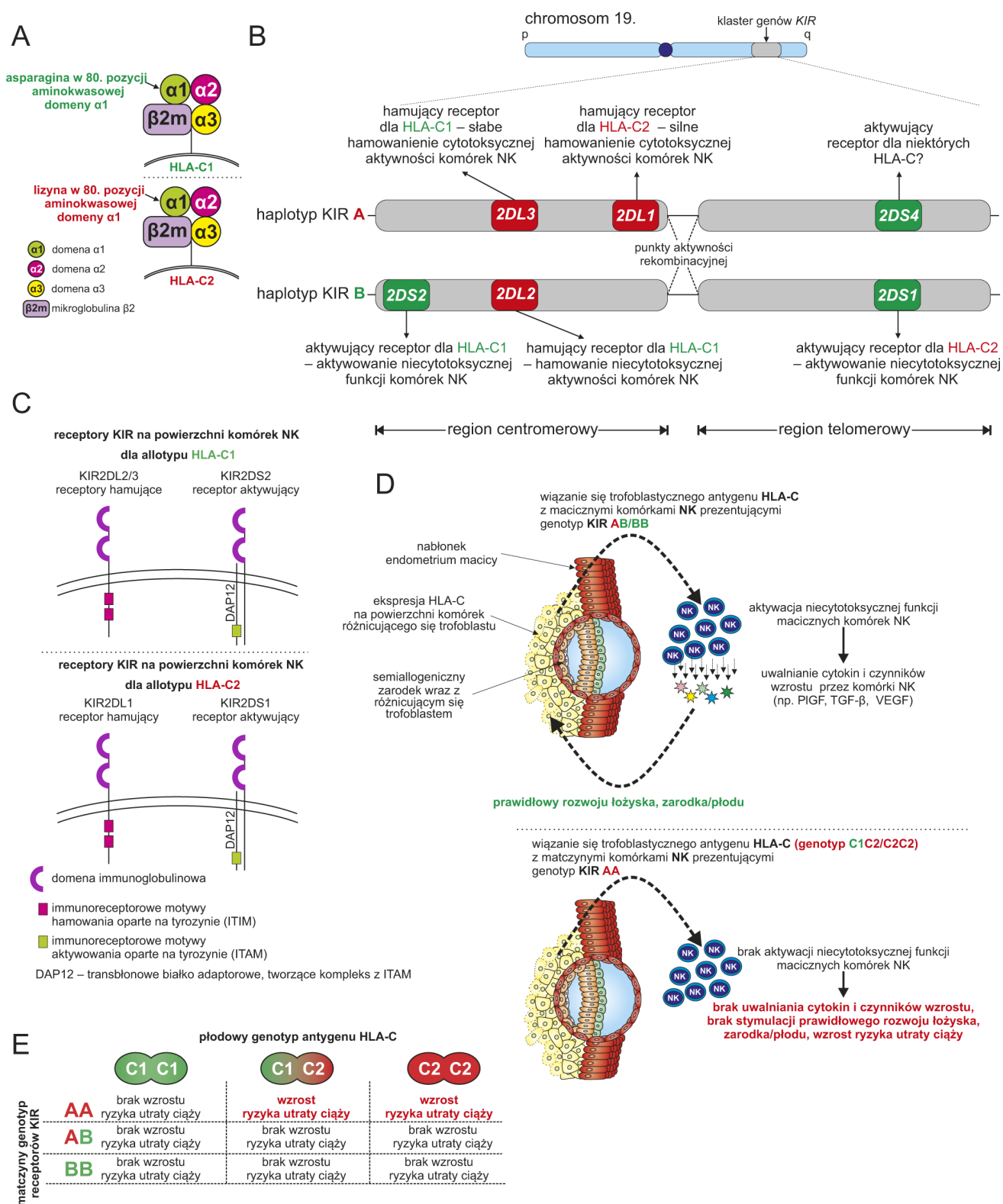
Oryginalne prace badawcze potwierdzają związek między antygenem HLA-C i jego receptorami KIR a RPL (*Elbaşı i wsp., 2020; Hiby i wsp., 2008, 2010*). *Elbaşı i wsp. (2020)* przeprowadzając badania na populacji tureckiej (pary z historią RPL w wywiadzie [3–6 poronień, brak wcześniejszej ciąży] vs. zdrowe pary z potomstwem) stwierdzili większą częstość homozygoty HLA-C2 w grupie mężczyzn z par z RPL ($n = 25$) w porównaniu do grupy mężczyzn z par zdrowych ($n = 24$) i populacji generalnej ($n = 1528$) oraz niższą częstość genu *KIR2DS3* w grupie kobiet z RPL ($n = 25$) w porównaniu do płodnych kobiet ($n = 39$). Z kolei, *Hiby i wsp. (2008)* również ujawnili większą częstość allotypu C2 zarówno u kobiet jak i u mężczyzn z par z RPL niż u par płodnych (brak powikłań łożyskowych, urodzenie dziecka z prawidłową masą ciała) (kaukaska grupa etniczna). Co więcej, w grupie kobiet z RPL wykazano większą częstość genotypu KIR AA niż w grupie kontrolnej. W następnych badaniach *Hiby i wsp. (2010)* potwierdzili, że współistnienie występowania genotypu KIR AA u kobiet i allotypu C2 płodu predysponuje do komplikacji przebiegu ciąży (hipotrofia wewnątrzmaciczna, nawracające poronienia). Autorzy stwierdzili większą częstość allotypu C2 płodu (komórki łożyska) (genotyp C2C2, C1C2) niż allotypu C2 u matki (genotyp C1C1, C1C2). Na tej podstawie pośrednio sugerowali, że za powikłania w czasie ciąży mógł być odpowiedzialny genotyp ojca (C2C2, C1C2).

Mutacje i polimorfizmy genów odpowiedzialnych za trombofilie

Trombofilia jest zespołem chorobowym, który charakteryzuje się zwiększoną skłonnością do powstawania zakrzepów żylnych, niekiedy tętniczych, spowodowanych zaburzeniami w układzie krzepnięcia. Wyróżniamy trombofilie wrodzone uwarunkowane genetycznie spowodowane jedno- lub dwuallelicznymi mutacjami bądź też polimorfizmami genów, które biorą udział w kaskadzie krzepnięcia i fibrynolizie: mutacja genu czynnika V krzepnięcia (1691G>A – mutacja Leiden)⁵, mutacja genu protrombiny (20210G>A)⁶ oraz polimorfizm (677C>T) genu *MTHFR* kodującego reduktazę 5,10-metylenotetrahydrofolianową (*MTHFR*, ang.

5 Czynn timer V krzepnięcia uczestniczy w szlaku pro- i antykoagulacyjnym. Czynn timer V Leiden jest wariantem czynn timer V, powstaje w wyniku mutacji punktowej 1691G>A (Leiden) genu kodującego czynn timer V zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 1. Powstałe białko podlega prawidłowej aktywacji w procesie krzepnięcia, niemniej jednak wykazuje oporność na działanie aktywowanego białka C, które spełnia rolę antykoagulacyjną. Mutacja Leiden dziedziczna w sposób dominujący zwiększa ryzyko chorób zakrzepowo-zatorowych.

6 Protrombina (czynn timer II krzepnięcia), nieaktywny rozpuszczalny prekursor trombiny występujący w surowicy krwi. Jest glikoproteiną wytwarzaną przez wątrobę w obecności witaminy K. Trombina odpowiedzialna jest za przekształcanie fibrynogenu do fibryny, która jest głównym białkiem skrzepu krwi. Mutacja punktowa 20210G>A występująca w regionie 3'UTR genu protrombiny zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 11 prowadzi do wzrostu stężenia protrombiny we krwi, a w następstwie do zwiększenia krzepliwości krwi, co zwiększa ryzyko chorób zakrzepowo-zatorowych. Mutacja 20210G>A dziedziczy się w sposób dominujący.



Ryc. 3. Budowa allotypów antygenu *HLA-C* (A), haplotypy genów *KIR* (B), budowa receptorów *KIR* (C), rola trofoblastycznego antygenu *HLA-C* w rozwoju łożyska, zarodka/płod (D) oraz znaczenie haplotypów genów *KIR* i allotypów antygenów *HLA-C* w utrzymaniu ciąży (E). NK – komórki naturalnej cytotoksyczności, PIGF – łożyskowy czynnik wzrostu, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β , VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (szczegóły w tekście)

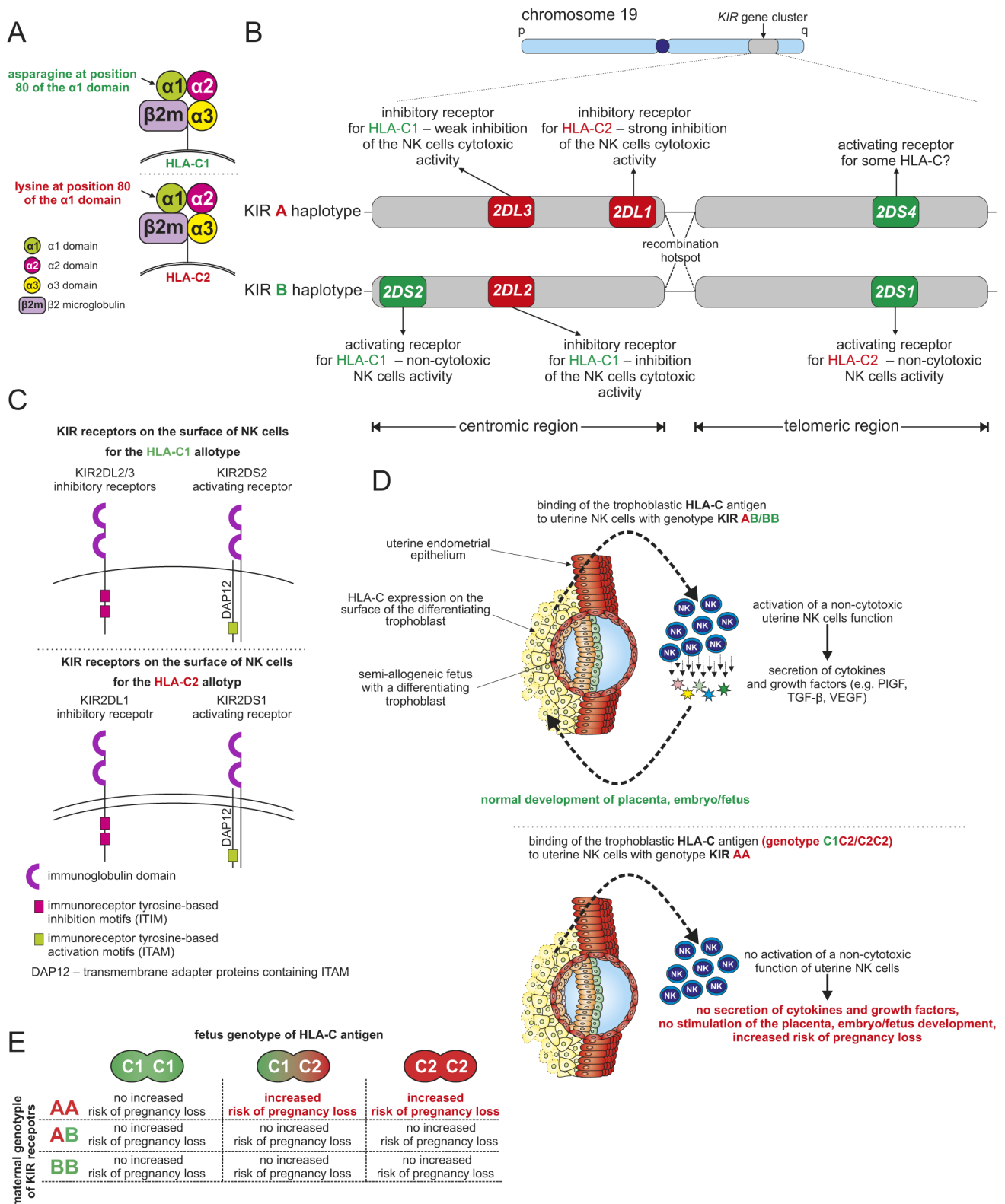


Fig. 3. Structure of HLA-C allotypes (A), KIR haplotypes (B), structure of KIR receptors (C), role of trophoblastic HLA-C antigen in development of placenta, embryo/fetus (D) and significance of KIR haplotypes and HLA-C antigen allotypes in pregnancy maintenance (E) NK – natural killer cells, PlGF – placental growth factor, TGF- β – transforming growth factor- β , VEGF – vascular endothelial growth factor (details in the text)

5,10-methylenetetrahydrofolate reductase)⁷. Dodatkowo zwraca się uwagę na wrodzone niedobory białek C⁸ i S⁹, a także niedobór antytrombiny III. Z kolei trombofilie nabyte mogą być spowodowane zespołem antyfosfolipidowym, trombocytopenią indukowaną heparyną oraz nieprawidłowościami białek uczestniczących w krzepnięciu (np. nabyta oporność na białko C). Ponadto czynnikiem ryzyka mogą być choroby nowotworowe, nocna napadowa hemoglobinuria, chemio- i radioterapia, palenie, otyłość i zaawansowany wiek (*Alecsandru i wsp.*, 2021; *Kurzawińska i wsp.*, 2009; *Pasińska i wsp.*, 2012; *Regan i wsp.*, 2011; *Stevens i wsp.*, 2016; *van Dijk i wsp.*, 2020; *Voicu i wsp.*, 2020). W przebiegu trombofilii dochodzić może do zakrzepicy w łożysku, niewydolności łożyskowej, stanu przedrzucawkowego oraz wewnątrzmacicznego zahamowania wzrastania płodu, a w efekcie poronień nawracających lub utraty płodu w drugiej połowie ciąży (*Barut i wsp.*, 2018; *Eslami i wsp.*, 2020; *Jivraj i wsp.*, 2006; *Puscheck i Jeyendran*, 2007; *Rastogi i wsp.*, 2019; *Voicu i wsp.*, 2020; *Youssef i wsp.*, 2020).

W przypadku kobiet wpływ defektów genów odpowiedzialnych za trombofilie na poronienia jest dobrze udokumentowany (*Ahangari i wsp.*, 2019; *Barut i wsp.*, 2018; *Eslami i wsp.*, 2020), natomiast w przypadku mężczyzn jest on niejednoznaczny. Jedni autorzy wskazują na mutację tych genów jako potencjalną przyczynę poronień (*Barut i wsp.*, 2018; *Jivraj i wsp.*, 2006; *De Galan-Roosen i wsp.*, 2005; *Regan i wsp.*, 2011; *Udry i wsp.*, 2014), inni z kolei nie wykazują związku między tymi mutacjami a poronieniami (*Pasquier i wsp.*, 2009; *Toth i wsp.*, 2008).

Jivraj i wsp. (2006) wykazali zmniejszoną szansę na urodzenie żywego dziecka, jeśli którykolwiek z partnerów był nosicielem więcej niż 1 mutacji powodującej trombofilie (mutacja Leiden, genu protrombiny 20210G>A, polimorfizm 677C>T genu *MTHFR*) w porównaniu z parami, u których nie stwierdzono tych mutacji. Względne ryzyko poronień nawracających wzrastało prawie 2-krotnie. Ponadto odsetek żywo urodzonych podczas następnej ciąży przy braku zastosowania profilaktyki zakrzepowozatorowej był zdecydowanie mniejszy (odpowiednio: 17% vs. 56%). Z kolei *Udry i wsp.* (2014) wykazali, że częstość mutacji Leiden genu czynnika V krzepnięcia była istotnie wyższa w grupie mężczyzn z par z historią RPL w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: 16,7% vs. 3%). W przypadku częstości mutacji genu protrombiny 20210 G>A nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych między porównywanymi grupami mężczyzn.

Ponadto autorzy ujawnili, że mutacja Leiden zwiększała ponad 6-krotnie ryzyko (OR = 6,47) wystąpienia poronień nawracających, co zostało również potwierdzone przez analizę retrospektywną opracowaną przez *Regan i wsp.* (2011). Wykazali oni, że mutacja Leiden była związana z 2-krotnym wzrostem częstości RPL w I trymestrze ciąży (OR = 2,01) oraz prawie 8-krotnym wzrostem po 22. tygodniu ciąży (OR = 7,83). Również *De Galan-Roosen i wsp.* (2005) ujawnili, że u mężczyzn z par z historią RPL częściej występowała oporność na aktywowane białko C (22% vs. 0% w grupie kontrolnej) powodująca prozakrzepowy defekt hemostazy (patrz przyp. 5 i 8). Z kolei *Toth i wsp.* (2008) oraz *Pasquier i wsp.* (2009) nie znaleźli żadnego istotnie statystycznego powiązania między mutacją Leiden, mutacją protrombiny 20210G>A oraz polimorfizmem 677C>T u mężczyzn z par z historią RPL.

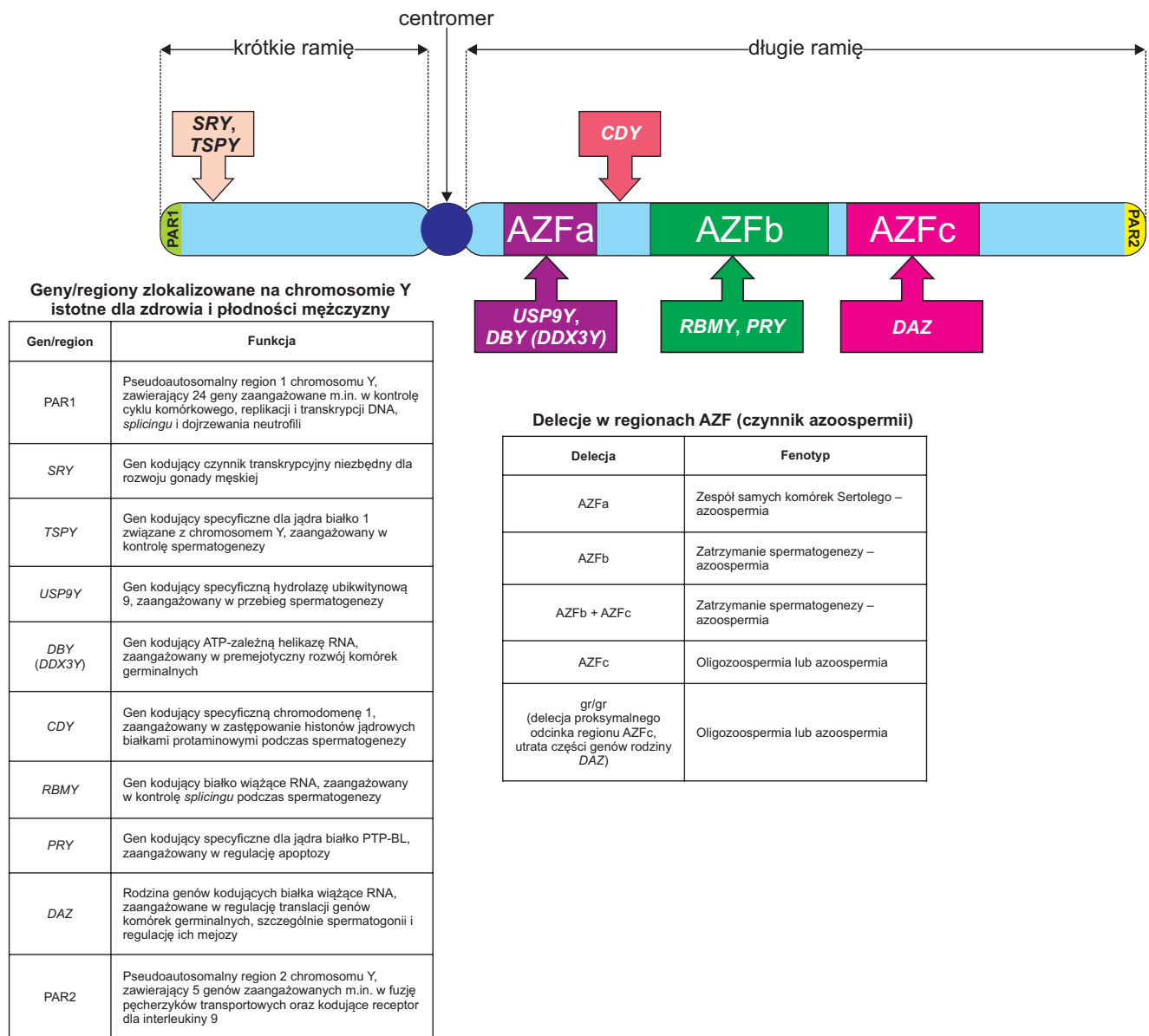
Mikrodelecje i polimorfizmy długiego ramienia chromosomu Y

Chromosom Y odgrywa istotną rolę zarówno podczas różnicowania się gonady męskiej, jak i w utrzymaniu zdrowia i płodności mężczyzny. Istotne geny/regiony zlokalizowane są na krótkim i długim ramieniu tego chromosomu. W obrębie długiego ramienia występuje zespół genów krytycznych dla spermatogenezy, nazwanych czynnikiem azoospermii (AZF, ang. *azoospermia factor*). W obrębie tego zespołu wyróżnia się 3 regiony: AZFa, AZFb oraz AZFc. Delekcje w tych regionach powodują hipospermatogenezę, kryptospermatogenezę, jej zatrzymanie bądź całkowity brak, stąd też prowadzą do niepłodności męskiej (rycina 4) (*Kayser*, 2017; *Krausz i Casamonti*, 2017; *O'Flynn i wsp.*, 2010; *Signore i wsp.*, 2020). Wśród mężczyzn niepłodnych od 2% do 4% ma mikrodelecję w regionie AZF (*Abur i wsp.*, 2019; *Arumugam i wsp.*, 2021). Aż 80% przypadków związanych jest z delecją AZFc powodującą azoospermie lub ciężką oligozoospermie. U ok. 66% mężczyzn z tą delecją wykazuje się obecność plemników w nasieniu (*Devan i wsp.*, 2006). Należy podkreślić, że weryfikacja mutacji w regionie AZFc rekomendowana jest, gdy w nasieniu występuje <1 mln/mL plemników. Z kolei bardzo rzadko stwierdza się delecję w tym regionie, gdy koncentracja plemników w nasieniu wynosi >5 mln/mL. Korzystny prognostycznie jest fakt, iż w przypadku azoospermii u mężczyzn z mutacją w AZFc istnieje szansa na pozyskanie plemników z jądra (TESE, ang. *testicular sperm extraction*). Z kolei delekcja regionu AZFb powodująca zatrzymanie spermatogenezy zdecydowanie zmniejsza szansę na zastosowanie metody TESE, która w tym przypadku nie jest rekomendowana, podobnie jak w przypadku delekcji w regionie AZFa prowadzącej do zespołu samych komórek Sertolego (SCOS, ang. *Sertoli cell-only syndrome*) (*Devan i wsp.*, 2006; *Dhanoa i wsp.*, 2016; *Dziuba*, 2017; *Kayser*, 2017; *Krausz i Casamonti*, 2017; *Witczak i wsp.*, 2013; *O'Flynn i wsp.*, 2010; *Signore i wsp.*, 2020).

7 Reduktaza *MTHFR* jest enzymem odgrywającym kluczową rolę w metabolizmie folianów i w regulacji stężenia homocysteiny i metioniny. Polimorfizm 677C>T genu *MTHFR* zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 1 prowadzi do nieprawidłowej aktywności reduktazy *MTHFR*, co w efekcie powoduje wzrost stężenia homocysteiny w surowicy krwi i w konsekwencji staje się czynnikiem ryzyka zmian zakrzepowych. Mutacja dziedziczy się w sposób dominujący.

8 Białko C, zależne od witaminy K, jako aktywna proteaza serynowa jest inhibitorem czynnika V i VIII krzepnięcia krwi.

9 Białko S jest glikoproteiną zależną od witaminy K, niezbędną do aktywacji białka C.



Ryc. 4. Schemat chromosomu Y z zaznaczonymi genami/regionami istotnymi dla rozwoju gonady męskiej, zdrowia i płodności mężczyzny

Trudno jednoznacznie ustalić, czy zmiany w długim ramieniu chromosomu Y są czynnikiem ryzyka RPL, dane z piśmiennictwa bowiem nie zawsze są zgodne. *Dewan i wsp. (2006)* u 14 z 17 mężczyzn z par z RPL (82%) stwierdzili mikrodelecje w proksymalnym regionie AZFc, w tym u 11 (65%) liczba mikrodelecji wynosiła >3. Zmian takich autorzy nie ujawnili w przypadku mężczyzn płodnych. Podobne wyniki uzyskali *Karaer i wsp. (2008)*. Badacze u 7 z 43 mężczyzn z par z RPL (16%) wykazali ≥1 mikrodelecji w regionie AZF (vs. 0% w grupie 43 mężczyzn płodnych). Większość mikrodelecji występowała w regionie AZFb. Z kolei *Wang i wsp. (2017)* u 12,03% mężczyzn z par z RPL (61 z 507) stwierdzili polimorfizmy (1qh+, inv(9), 9qh+, 16qh+, grup D/G, Yqh- and Yqh+) w długim ramieniu chromosomu Y (vs. 2,15% w grupie 465 mężczyzn płodnych). Ryzyko występowania badanych zmian polimorficznych u tych

mężczyzn było zdecydowanie wyższe w porównaniu z grupą płodną i zależało od rodzaju polimorfizmu (OR od 2,805 do 12,07).

Nie można pominąć faktu, że istnieją doniesienia, w których autorzy nie wykazują związku między mikrodelecjami w regionie AZFa, AZFb, AZFc a RPL i nie rekomendują genetycznej analizy długiego ramienia chromosomu Y w przypadku mężczyzn z par z RPL (*Ahmadi i wsp., 2018; Bellver i wsp., 2010; Ghorbian i wsp., 2012; Perez i wsp., 2013; Wettasinghe i wsp., 2010*).

Zaburzenia epigenetyczne

Obok zmian genetycznych oraz cytogenetycznych, obejmujących mutacje, polimorfizmy i strukturalne zaburzenia chromosomów, w etiopatogenezie poronień

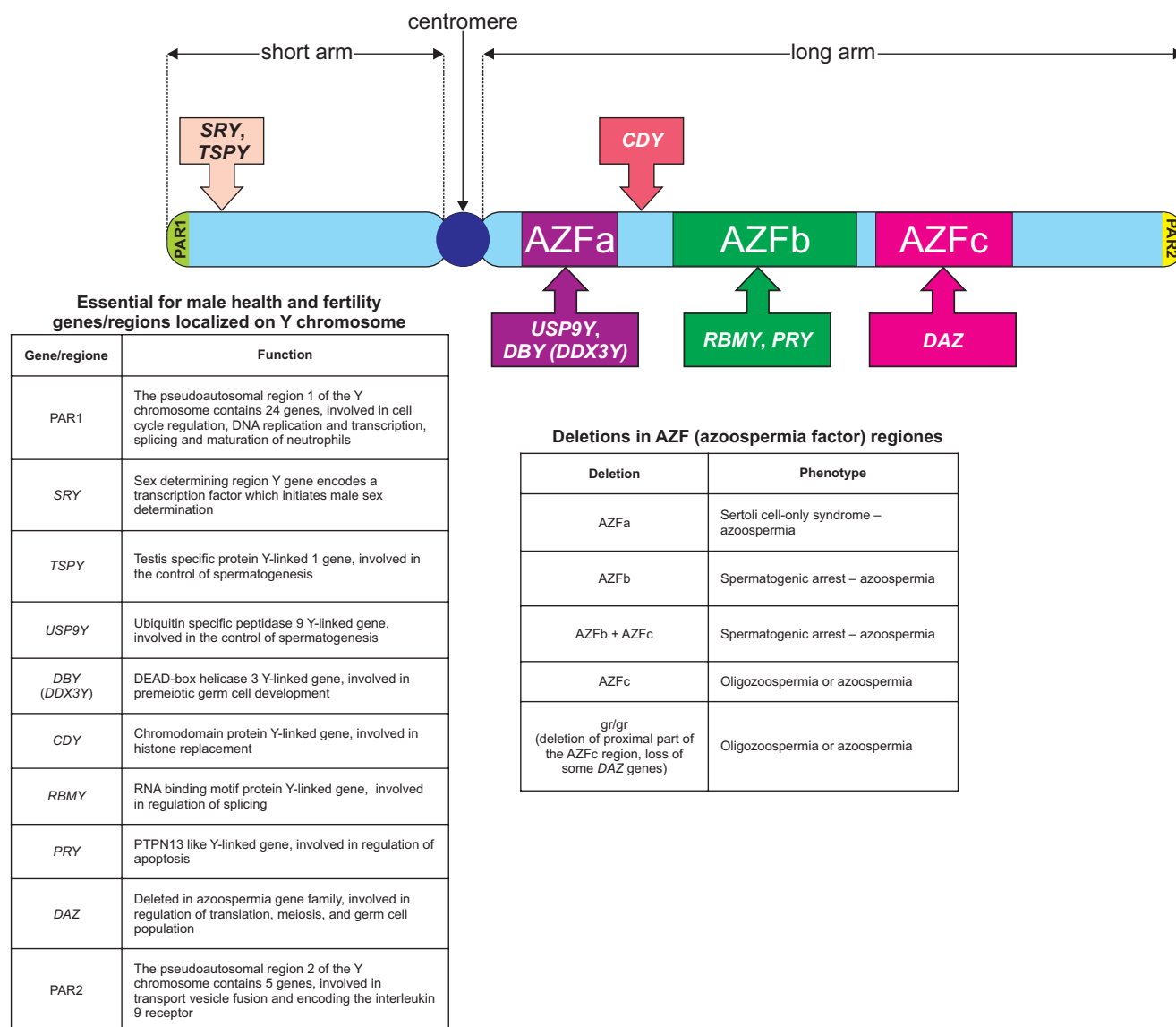
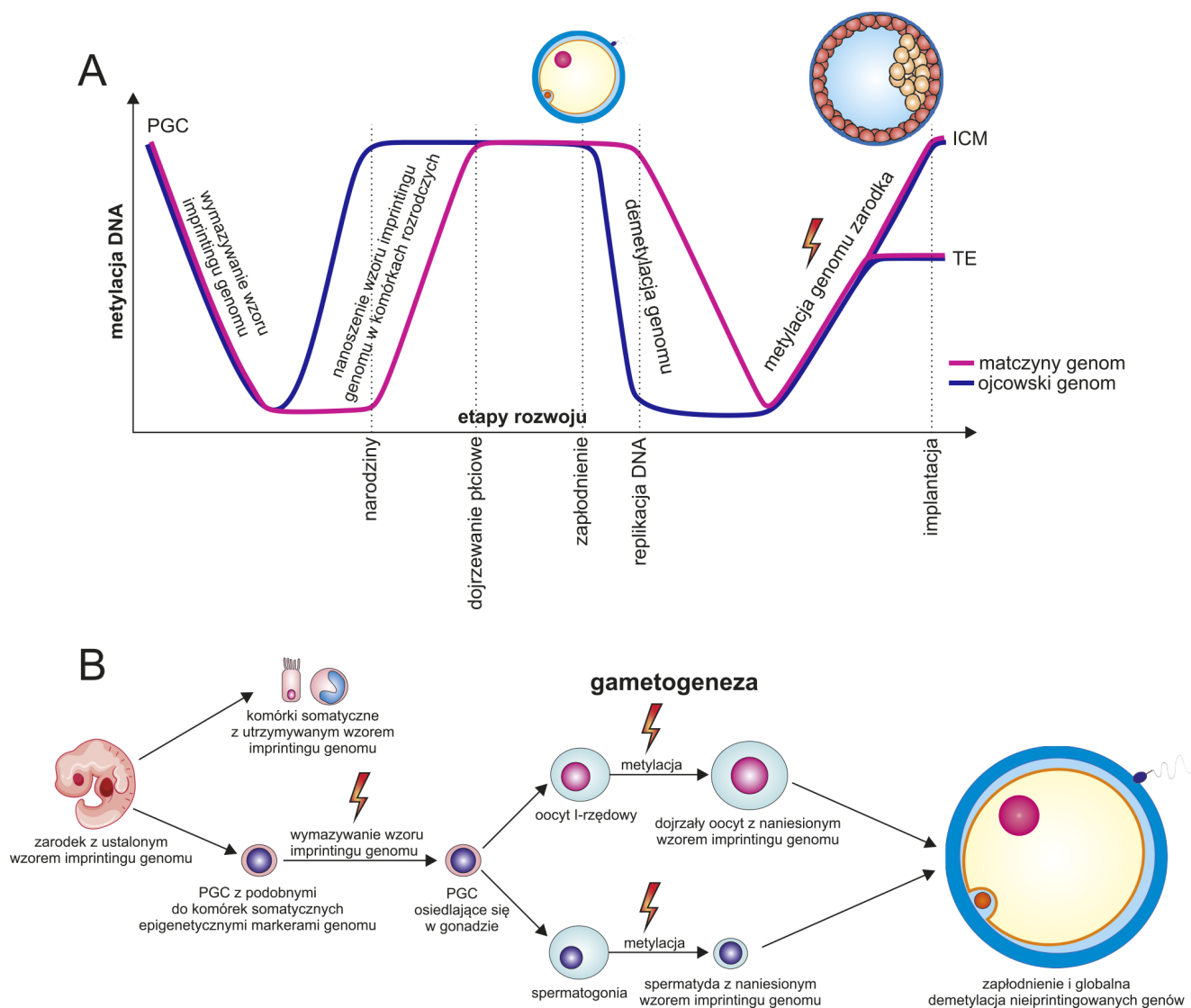


Fig. 4. Scheme of Y chromosome displaying genes/regions associated with testis development, male health and fertility

na znaczeniu zyskują również badania dotyczące zmian epigenetycznych (Cheung i wsp., 2019; El Hajj i wsp., 2011; Ibrahim i Hotaling, 2018). W odróżnieniu od mutacji, zmiany epigenetyczne odpowiedzialne są za kontrolę ekspresji materiału genetycznego bez zmian w jego nukleotydowej sekwencji. Jednym z mechanizmów tej kontroli jest tzw. piętno genomowe (imprinting genomic, ang. *genomic imprinting*) (rycina 5). Kontroluje ono dostępność genów i ich promotorów dla czynników transkrypcyjnych, reguluje ekspresję 1–2% genów kodujących białka ludzkiego organizmu. Mechanizm ten oparty jest na znacznikach epigenetycznych, które pozwalają komórce rozróżniać rodzicielskie pochodzenie alleli, co skutkuje monoalleliczną ekspresją kopii genu odziedziczonej po matce lub po ojcu. Główne modyfikacje materiału genetycznego w tym procesie to: 1) metylacja cytozyny w wyspach CpG (rejonu DNA bogate w cytozynę i guaninę) zlokalizowanych między innymi w promotorach genów i w regionach DNA o zróżnicowanej metylacji

(DMR, ang. *differentially methylated regions*) i 2) metylacja histonów. Co interesujące, materiał genetyczny męskich gamet wydaje się bardziej podatny na zaburzenia epigenetyczne niż komórki somatyczne, ponadto zaburzenia te zwiększają się wraz z wiekiem mężczyzny. Jak wykazali Jenkins i wsp. (2014) średnia liczba zmian w metylacji genomu plemników w regionach hipermetylowanych wynosiła 0,3% rocznie a w regionach hipometylowanych 0,28%, podczas gdy w komórkach somatycznych było to tylko 0,15%. Należy wyraźnie podkreślić, że błędy w imprintingu materiału genetycznego, w tym ojcowskiego, podobnie jak mutacje są dziedziczone, zatem mogą przyczyniać się zarówno do nieprawidłowego rozwoju zarodka i/lub niskiego wskaźnika uzyskiwanych ciąży, jak i wzrostu częstości poronień. Dzieje się tak ponieważ prawidłowy wzór ekspresji genów ojcowskich i matczynych ma kluczowe znaczenie dla rozwoju i funkcjonowania zarodka oraz łożyska (Arias-Sosa i wsp., 2018; Elbracht i wsp., 2020; Marques i wsp., 2017; Sebire i wsp., 2020).



Ryc. 5. Schemat przedstawiający zmiany poziomu metylacji DNA w czasie życia płodowego, ontogenezy oraz zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodka (A) ze szczególnym uwzględnieniem zmian w poziomie metylacji genomu komórek PGC i gamet (B). Specyficzne dla rodzicielskich alleli znaczniki epigenetyczne są dziedziczne, ale muszą być „wymazywane” w każdym kolejnym pokoleniu. U ssaków podczas gametogenezy i wczesnej embriogenezy zachodzą dwa główne zdarzenia epigenetycznego przeprogramowania całego genomu. Po zapłodnieniu dochodzi do globalnej demetylacji rodzicielskiego DNA. Ojcowski genom w sposób aktywny jest demetylowany już przed pierwszym podziałem zygoty (na etapie przedjądźry), z kolei matczyński jest demetylowany pasywnie później w czasie wczesnych podziałów blastomerów zarodka aż do osiągnięcia stadium blastocysty. Następnie, przed implantacją zarodka do endometrium macicy, nanoszony jest *de novo* wzór metylacji DNA zależny od płci zarodka i od przeznaczenia komórek (komórki ICM wykazują wyższy poziom metylacji DNA niż komórki TE). Ustalony nowy wzór metylacji utrzymuje się w komórkach zarodka, za wyjątkiem komórek PGC. W tych komórkach zostaje usunięty wzór metylacji DNA, a następnie jest on nanoszony ponownie w czasie gametogenezy. Nieprawidłowy wzór metylacji DNA może być efektem nieprawidłowego imprintingu genomu podczas gametogenezy, w wyniku niepowodzenia w usuwaniu i ustaleniu nowego wzoru metylacji lub może być efektem braku utrzymania wzoru metylacji nanoszonego po zapłodnieniu (patrz błyskawice na rycinie). Co ważne, nieprawidłowości te mogą być przyczyną nieprawidłowego rozwoju zarodka i stać się czynnikiem idopatycznych poronień lub też mogą nie powodować utraty ciąży. Konsekwencją tego mogą być choroby związane z nieprawidłowym imprintingiem (rzadkie choroby, często o bardzo ciężkim przebiegu). Wskazuje to, że odpowiednia ekspresja niewielkiej grupy genów (1–2%) jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju. ICM – węzeł zarodkowy, PGC – komórki prapłciowe, TE – trofoblastyczna warstwa zewnętrzna (*Gunes i Esteves, 2021; Ishida i Moore, 2013; Elbracht i wsp., 2020; Swales i Spears, 2005*).

Wpływ znaczenia zaburzeń imprintingu genomu plemników na sukces rozrodczy potwierdzają wyniki badań *El Hajj i wsp. (2011)*. Autorzy ci ujawnili dodatnią zależność między poziomem metylacji regionów ALU¹⁰

10 Sekwencje ALU to wielokrotnie powtórzone (ok. 1 mln) sekwencje nukleotydowe (280 par zasad) występujące w ludzkim genomie. Sekwencje ALU należą do transpozonów (skaczących genów), a dokładnie do retrotranspozonów. Sekwencje retrotranspozonowe przepisane są na RNA a następnie za pomocą odwrotnej transkryptazy na DNA i z wykorzystaniem integracji wbudowywane w nowe loci.

(retrotranspozonów) a urodzeniem żywego dziecka, jednocześnie wykazując, że obniżenie poziomu metylacji tych regionów może prowadzić do poronień. Również *Khambata i wsp. (2021)*, w genomie plemników mężczyzn z par z historią RPL, ujawnili znaczny spadek globalnego poziomu metylacji DNA, spadek poziomu metylacji wysp CpG w promotorze genów należących do LINE-1¹¹ oraz

11 LINE-1 (ang. *long interspersed nuclear elements*) to długie rozproszone sekwencje retrotranspozonowe o wielkości przynajmniej kilku tysięcy par zasad.

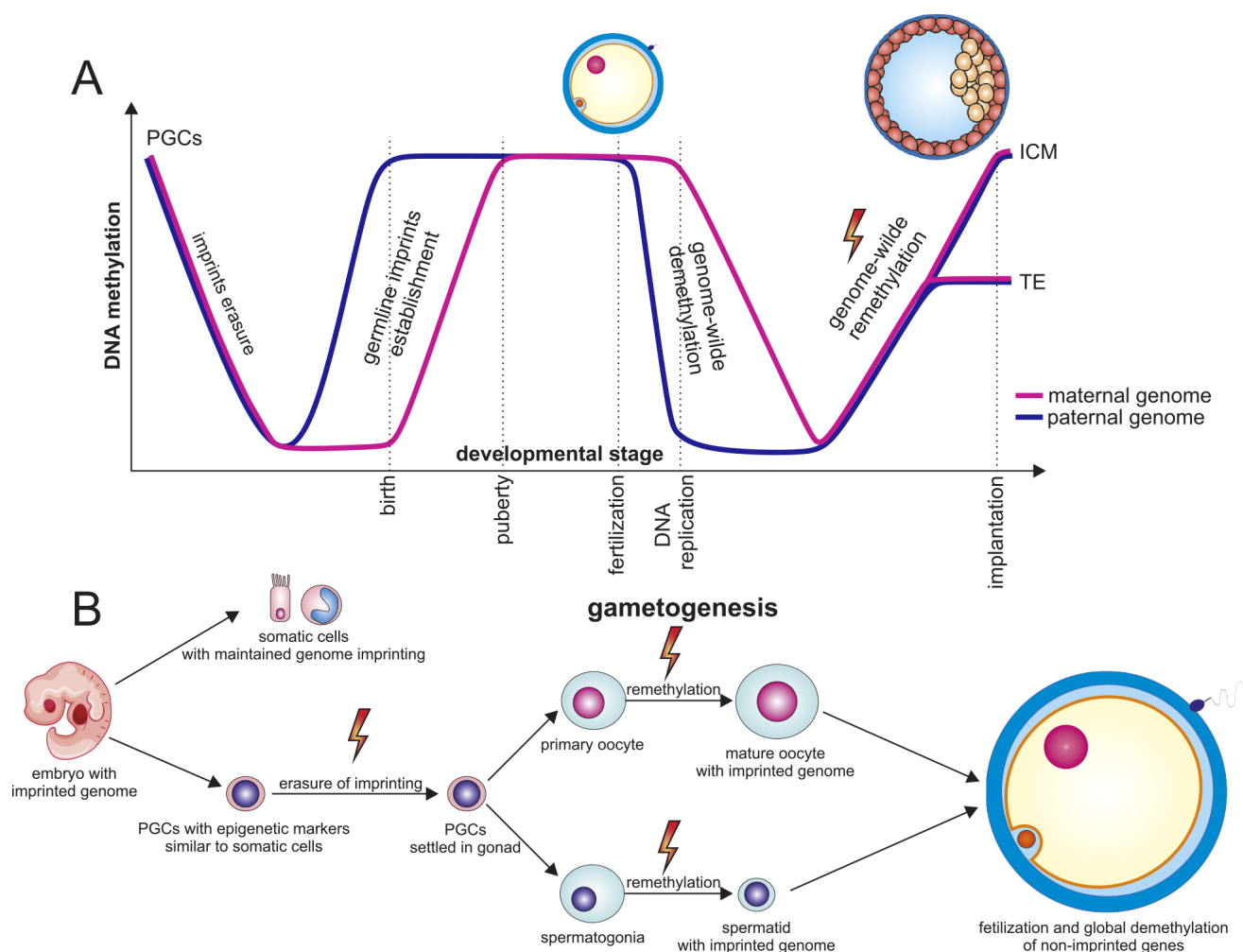


Fig. 5. Scheme showing changes in the DNA methylation level during fetal life, ontogenesis, fertilization and early embryo development (A) with particularly emphasis on changes in genome methylation occurring in PGCs and gametes (B). Maternal and paternal allele-specific epigenetic markers are inherited but have to be 'erased' in each generation. Two major events of genome-wide epigenetic reprogramming take place in mammals during gametogenesis and early embryogenesis. After fertilization, global demethylation is carried out. The paternal genome undergoes active demethylation before the first zygote division (at the pronuclei stage), while maternal genome is demethylated later by a DNA replication-dependent passive mechanism, until embryo reach blastocyst stage. Then, before implantation, *de novo* DNA methylation pattern is established depending on the embryo sex and the cell type (ICM cells have been found to carry higher methylation than the TE cells). The established new DNA methylation pattern is maintained in the embryo cells, except for PGCs. In PGCs, the DNA methylation pattern is 'erased' and *de novo* established during gametogenesis. The abnormal DNA methylation pattern may be a defect introduced during spermatogenesis (failure of 'erasure' and remethylation of DNA) or it may arise from ineffective post-fertilization methylation maintenance (see lightning in figure). Importantly, these abnormalities may cause the abnormal development of the embryo and become a factor of idiopathic miscarriages or it may not result in pregnancy loss, but may lead to diseases associated with disturbed imprinting (rare and often very severe diseases). This indicates that the proper expression of a small group of genes (1–2%) is crucial for normal development. ICM – inner cell mass, PGCs – primordial germ cell, TE – trophoblast (Gunes and Esteves, 2021; Ishida and Moore, 2013; Elbracht et al., 2020; Swales and Spears, 2005).

w regionach DMR genów *IGF2/H19*¹², a także w regionach IG-DMR¹³.

Jednakże badania dotyczące wpływu tych zmian na ryzyko wystąpienia poronień wciąż są nieliczne i nie zawsze są zgodne. Przykładowo, *Poorang i wsp. (2018)*

12 Gen *H19* znajduje się w ulegającym imprintingowi regionie chromosomu 11 w pobliżu genu insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (*IGF2*, ang. *insulin-like growth factor 2*). Ten gen jest aktywny tylko w chromosomie dziedziczonym po matce, podczas gdy *IGF2* jest aktywny tylko w chromosomie dziedziczonym po ojcu. Produktem tego genu jest długi niekodujący RNA, który działa jako supresor nowotworu. Mutacje w tym genie powiązane z zespołem Beckwitha-Wiedemanna i nowotworem Wilmsa.

13 IG-DMR (ang. *intergenic germline-derived differentially methylated regions*) to sekwencje DNA o zróżnicowanej metylacji, których wzorce metylacji ustalają się w komórkach zarodkowych po zapłodnieniu

nie wykazali różnic w częstości epigenotypu metylacji promotora genu *MTHFR* w plemnikach mężczyzn z par z historią PRL w odniesieniu do mężczyzn z potwierdzoną płodnością. Stąd też, uzasadniona wydaje się konieczność prowadzenia dalszych badań w celu dogłębnej weryfikacji znaczenia zmian epigenetycznych genomu plemników w poronieniach.

Standardowe parametry nasienia

Nie ulega wątpliwości, że konwencjonalna ocena nasienia odgrywa istotną rolę w postępowaniu diagnostycznym i terapeutycznym w przypadku niepłodności partnerskiej.

W standardowym badaniu seminologicznym ocenia się nie tylko plemniki, ale także cały ejakulat. Analiza składa się z oceny mikroskopowej (np. całkowita liczba, koncentracja, ruchliwość, morfologia, żywotność plemników) oraz makroskopowej (np. czas upłynięcia, wygląd, objętość, pH, lepkość nasienia). Biorąc pod uwagę wyniki podstawowej oceny seminologicznej, wielu autorów podejmowało próbę znalezienia związku między nimi a poronieniami. Należy wyraźnie podkreślić, że związek między standardowymi parametrami nasienia a poronieniami może mieć charakter pośredni, bowiem jak wspomniano już wcześniej, m.in. aberracje chromosomowe, nie obojętne dla przebiegu spermatogenezy, są czynnikiem etiologicznym obniżonych parametrów seminologicznych i poronień (*Almesned i wsp., 2020; Kar i wsp., 2018; Magli i wsp., 2020; Ramasamy i wsp., 2015b*).

Uzyskane dane nie zawsze są jednoznaczne i zgodne. Jedni autorzy wykazują związek między konwencjonalną charakterystyką plemników a RPL, inni nie potwierdzają tego związku, co więcej wykazują go jedynie między wyselekcjonowanymi parametrami nasienia (*Carlini i wsp., 2017; Eisenberg i wsp., 2017; Li i wsp., 2021; Zhang i wsp., 2012, 2020; Zidi-Jrah i wsp., 2016*). Na podstawie przeglądu piśmiennictwa można stwierdzić, że średnia liczba plemników z ruchem postępowym w grupie mężczyzn płodnych (grupa kontrolna) była 1,69-krotnie (*Venkatesh i wsp., 2011*), 1,7-krotnie (*Zidi-Jrah i wsp., 2016*), 1,26-krotnie (*Gil-Villa i wsp., 2010*) oraz 1,14-krotnie (*Absalan i wsp., 2012*) większa niż w grupach mężczyzn z par z RPL w wywiadzie (grupa badana). Z kolei całkowita ruchliwość plemników była 1,83-krotnie (*Brahem i wsp., 2011*), 1,67-krotnie (*Imam i wsp., 2011*), 1,42-krotnie (*Bellver i wsp., 2010*) oraz 1,26-krotnie (*Bhattacharya, 2008*) większa w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą RPL. Podobnie koncentracja plemników była 4,3-krotnie (*Venkatesh i wsp., 2011*), 1,44-krotnie (*Bellver i wsp., 2010*), 1,23-krotnie (*Zhang i wsp., 2012*) oraz 1,21-krotnie (*Gil-Villa i wsp., 2010*) większa w grupie mężczyzn płodnych niż w grupie mężczyzn z par z RPL. Biorąc pod uwagę odsetek plemników morfologicznie prawidłowych, był on 1,8-krotnie (*Zidi-Jrah i wsp., 2016*), 1,51-krotnie (*Absalan i wsp., 2012*), 1,47-krotnie (*Carrell i wsp., 2003*), 1,42-krotnie (*Imam i wsp., 2011*), 1,38-krotnie (*Gil-Villa i wsp., 2010*), 1,2-krotnie (*Venkatesh i wsp., 2011*), 1,19-krotnie (*Zhang i wsp., 2012*) i 1,12-krotnie (*Khadem i wsp., 2014*) większy w grupie mężczyzn płodnych niż w grupie badanej. Dodatkowo wady główki ponad 1,5-krotnie częściej występowały u mężczyzn z par z RPL (*Zidi-Jrah i wsp., 2016*). Potwierdzeniem znacznego wpływu parametrów nasienia na występowanie poronień jest metaanaliza z 2020 r. (*Zhang i wsp., 2020*), w której grupą badawczą stanowiło prawie 2500 mężczyzn z par z niewyjaśnionymi przyczynami RPL. Ujawniono, iż w nasieniu tych mężczyzn była istotnie obniżona całkowita liczba plemników, ich koncentracja, ruchliwość oraz morfologia w porównaniu z grupą kontrolną mężczyzn płodnych.

Nie można jednak pominąć faktu, że w dostępnym piśmiennictwie istnieją doniesienia, w których nie wykazano różnic między grupą kontrolną a grupą mężczyzn z par z RPL w przypadku objętości nasienia (*Brahem i wsp., 2011; Eisenberg i wsp., 2017; Zhu i wsp., 2020*), koncentracji plemników (*Bhattacharya, 2008; Brahem i wsp., 2011; Carrell i wsp., 2003; Eisenberg i wsp., 2017; Zidi-Jrah i wsp., 2016*), ich morfologii (*Brahem i wsp., 2011; Eisenberg i wsp., 2017*) oraz ruchu postępowego (*Bhattacharya, 2008; Eisenberg i wsp., 2017*). Stąd też w przypadkach trudnych klinicznie nie można poprzestać tylko na standardowej ocenie seminologicznej, która jak wiadomo nie zawsze dostarcza wyczerpujących informacji dotyczących zdolności plemników do zapłodnienia. Dlatego też wielu autorów uzupełnia standardową charakterystykę plemników o ocenę statusu ich chromatyny i stresu oksydacyjnego w nasieniu (*Agarwal i wsp., 2019; Dhawan i wsp., 2019; Esteves i wsp., 2021; Jayasena i wsp., 2019; Khadem i wsp., 2014; Selvam i wsp., 2021; Zhang i wsp., 2020; Zhu i wsp., 2020*).

■ Stres oksydacyjny w nasieniu

Stres oksydacyjny jest spowodowany zachwianiem równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*) (rodnik hydroksylowy, tlen singletowy, nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy) a ochronnym działaniem antyoksydacyjnym obejmującym układ enzymatyczny (np. dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationu, reduktaza glutationu, katalaza) jak i nieenzymatyczny (np. witaminy A, E, C, B, glutation, koenzym Q10, karnityna, tauryna, hipotauryna, cysteina, homocysteina, laktoferyna, cynk, miedź, selen). Stanowić może czynnik etiologiczny wielu zaburzeń ogólnoustrojowych, w tym niepłodności męskiej (*Aitken i Drevet, 2020; Fraczek i Kurpisz, 2015; Ritchie i Ko, 2021; Walczak-Jedrzejowska, 2015; Walczak-Jedrzejowska i wsp., 2013*). W sposób fizjologiczny RFT uczestniczą w procesie spermiogenezy, apoptozy, proliferacji, przekazywania sygnałów wewnątrz- i międzykomórkowych oraz prawidłowym zapłodnieniu. Ich stężenie może rosnać w wielu sytuacjach klinicznych. Wyróżniamy czynniki egzogenne i endogenne powodujące wzrost RFT. Do pierwszych należą styl życia (palenie papierosów, otyłość, stres, alkohol, nieprawidłowa dieta uboga w antyoksydanty), zaawansowany wiek, zaburzenia endokrynologiczne, zawodowe i środowiskowe narażenie na metale ciężkie, toksyny i temperaturę, niektóre leki, przebyta chemio- i radioterapia. Do endogennych czynników wpływających na poziom stresu oksydacyjnego należą miejscowe stany zapalne/infekcyjne układu moczowo-płciowego, zaburzenia procesu spermatogenezy, choroby układowe, żylaki powrózka nasiennego, wnetrostwo, wazektomia oraz niewydolność układu antyoksydacyjnego (*Agarwal i Majzoub, 2017; Agarwal i wsp., 2019; Aitken i Drevet, 2020; Aitken i wsp., 2003; Dutta i wsp., 2019; Esteves i wsp., 2021; Walczak-Jedrzejowska, 2015*).

W wyniku stresu oksydacyjnego w układzie płciowym męskim dochodzi do peroksydacyjnego uszkodzenia fosfolipidów błon komórkowych, co w efekcie powoduje obniżenie ich płynności oraz zmniejszenie ich funkcji transportowych i receptorowych. Jednym z produktów peroksydacji lipidów jest cytotoksyczny dialdehyd malonowy (MDA, ang. *malonodialdehyde*), którego stężenie rośnie wraz ze zwiększonym wydzielaniem RFT. W dalszym etapie powstałe aldehydy mogą uszkadzać zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe. Oksydacyjne uszkodzenie białek dotyczy przede wszystkim tych aminokwasów, które zawierają grupy sylfhydrylowe (-SH). W wyniku ich utleniania powstają mostki dwusiarczkowe (-S-S-). Ponadto ma miejsce nieodwracalna modyfikacja aminokwasów (np. wprowadzenie grup karbonylowych lub hydroksyloowych), fragmentacja łańcucha polipeptydowego i tworzenie się niekorzystnych wiązań wewnątrz cząsteczki białka i pomiędzy nimi, co może powodować utratę aktywności biologicznej białka, zaburzenie działania enzymów i transporterów błonowych. Z kolei w wyniku uszkodzenia materiału genetycznego przez RFT wykrywa się modyfikację zasad azotowych (np. 8-OHdG – 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna) i reszt cukrowych, a także rozerwanie wiązań fosfodiesterowych łańcucha DNA. W konsekwencji dochodzi do fragmentacji zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA (mogą powstawać pojedyncze i podwójne nacięcia nici DNA) (Agarwal i wsp., 2017, 2020, 2021; Ahmadi i wsp., 2016; Barati i wsp., 2020; Gill i wsp., 2019; Ritchie i Ko, 2021; Walczak-Jedrzejowska i wsp., 2013).

Nie ulega wątpliwości, że zmiany, jakie mogą zachodzić w układzie płciowym męskim pod wpływem stresu oksydacyjnego na poziomie komórkowym, będą skutkowały zaburzeniami spermatogenezy i w konsekwencji mogą prowadzić do oksydacyjnego uszkodzenia męskich komórek rozrodczych skutkującego zaburzeniem ich czynności i finalnie obniżeniem płodności mężczyzny lub wystąpieniem niepłodności. Wykazuje się bowiem, że aż w 80% niepłodności idiopatycznej męskiej ma miejsce stres oksydacyjny w nasieniu. Co więcej, stres ten przenoszony do żeńskich dróg rodnych może niekorzystnie wpływać nie tylko na proces kapacytacji męskich gamet, ale także na komórkę jajową i rozwijający się zarodek, a w efekcie powodować jego poronienie, zarówno w przypadkach naturalnej koncepcji, jak i wspomaganych medycznie (Agarwal i Majzoub, 2017; Agarwal i wsp., 2019, 2021; Aitken i Drevet, 2020; Dhawan i wsp., 2017, 2019; du Fossé i wsp., 2020; Gil-Villa i wsp., 2009; Shamsi i wsp., 2011; Showell i wsp., 2014). Należy zwrócić uwagę – o czym wspomniano już wcześniej – że jednym z etiologicznych czynników stresu oksydacyjnego w nasieniu są stany zapalne/infekcyjne w męskim układzie moczowo-płciowym (np. zapalenie gruczołu krokowego, pęcherzyków nasiennych, dróg moczowych) związane ze wzrostem mikropatogenów, leukocytów i cytokin prozapalnych (np. IL-1 β , IL-6, TNF- α), które jak sugeruje się mogą niekorzystnie wpływać na parametry

seminologiczne i przebieg ciąży. Stąd wnikliwa analiza biomarkerów stanu zapalnego/infekcji jest jak najbardziej uzasadniona (Aitken i Drevet, 2020; Fraczek i Kurpisz, 2015; Havrylyuk i wsp., 2015; Liu i wsp., 2021; Walczak-Jedrzejowska, 2015).

Badacze potwierdzają związek stresu oksydacyjnego z poronieniami. Wykazano wyższe stężenie RFT w nasieniu mężczyzn z par z RPL w porównaniu z grupą mężczyzn z par płodnych (Dhawan i wsp., 2019; Jayasena i wsp., 2019; Kamkar i wsp., 2018; Shamsi i wsp., 2011; Venkatesh i wsp., 2011). Stężenie to było ok. 19,5-krotnie (Venkatesh i wsp., 2011), 9,3-krotnie (Shamsi i wsp., 2011), 4,5-krotnie (Jayasena i wsp., 2019) oraz 1,8-krotnie wyższe (Dhawan i wsp., 2019). Wykazano, że aż 62,5% mężczyzn z par z RPL miało podwyższone stężenie RFT w nasieniu (vs. 32,5% mężczyzn z par płodnych) (Shamsi i wsp., 2011). Interesujące wyniki uzyskali Dhawan i wsp. (2019). Badacze analizując krzywą ROC (ang. *receiver operating characteristic*) i pole powierzchni pod tą krzywą (AUC, ang. *area under curve*), ujawnili, że wartością graniczną (odcietcia) stężenia RFT w nasieniu mężczyzn była wartość 27,88 RLU/s/mln plemników (metoda chemiluminescencji), powyżej której statystycznie wzrastało ryzyko poronienia. Aż 69,4% badanych mężczyzn z par z RPL miało stężenie RFT powyżej eksperymentalnie ustalonej wartości granicznej (vs. 24,6% mężczyzn z par płodnych). Co więcej, autorzy tych badań podają, że ryzyko wystąpienia poronienia było ponad 4-krotnie wyższe, gdy stężenie RFT w nasieniu wynosiło powyżej uzyskanej wartości odcietcia (Dhawan i wsp., 2019).

Nie można pominąć faktu, że w przypadku stresu oksydacyjnego w nasieniu istnieje ryzyko obniżenia jakości nasienia, w tym integralności jądrowego DNA plemników, co w konsekwencji może upośledzać proces zapłodnienia, rozwój zarodka i uzyskanie ciąży (Agarwal i wsp., 2019, 2020; Aitken i wsp., 2017; Baskaran i wsp., 2021; Bellver i wsp., 2010; Cho i Agarwal, 2018; Dhawan i wsp., 2019; Esteves i wsp., 2021; Homa i wsp., 2019; Jayasena i wsp., 2019; Kamkar i wsp., 2018; Selvam i wsp., 2021; Shamsi i wsp., 2011; Venkatesh i wsp., 2011). Stąd też na szczególną uwagę zasługują badania, w których autorzy wykazują korzystny wpływ suplementacji antyoksydantami (np. β -karoten, witamina C, witamina E, koenzym Q10, L-karnityna, cynk, likopen) na konwencjonalne parametry seminologiczne, obniżenie stresu oksydacyjnego, zwiększenie integralności DNA plemników, liczby uzyskanych ciąż oraz żywych urodzeń (Agarwal i wsp., 2019; Ahmadi i wsp., 2016; Cardoso i wsp., 2018; Gil-Villa i wsp., 2009; Ross i wsp., 2010; Showell i wsp., 2014). Na podstawie przeprowadzonej metaanalizy Showell i wsp. (2014) wykazali, że stosowanie antyoksydantów u mężczyzn z obniżoną płodnością lub niepłodnych (od 3 do 26 tygodni) może zwiększać ponad 3-krotnie szansę na uzyskanie ciąży oraz ponad 4-krotnie szansę na żywe urodzenia. Ponadto 2-miesięczna lub 3-miesięczna terapia antyoksydantami mężczyzn z par korzystających z zapłodnienia *in vitro*

pozwoili na uzyskanie odpowiednio 48,3% ciąż klinicznych (vs. 6,9%) lub 38,5% (vs. 16%) (*Ahmadi i wsp.*, 2016; *Ross i wsp.*, 2010). Ujawniono także, że minimum 3-miesięczna suplementacja antyoksydantami w grupie mężczyzn z par z RPL, podwyższonym indeksem fragmentacji jądrowego DNA plemników (DFI >24, ang. *DNA fragmentation index*) lub ze zwiększoną peroksydacją jego lipidów umożliwiła uzyskanie potomstwa w przypadku 6 z 9 suplementowanych mężczyzn (*Gil-Villa i wsp.*, 2009). Z przeglądu piśmiennictwa jednak wynika, że wpływ terapii antyoksydantami na zmniejszenie odsetka poronień nie jest oczywisty i wymaga większej liczby badań randomizowanych (*Showell i wsp.*, 2014).

■ Status chromatyny plemnika

Status chromatyny plemnika (integralność DNA, protaminacja, odpowiednia ilość histonów jądrowych, prawidłowa kondensacja chromatyny) coraz powszechniej staje się uznanym i rekomendowanym biomarkerem, zwłaszcza w takich przypadkach jak: zylaki powrózka nasienne, idiopatyczna niepłodność, niepłodność związana ze stylem życia, parametry seminologiczne na granicy prawidłowe/nieprawidłowe, zastosowanie technik wspomaganą prokreacji oraz w przypadkach nawracających poronień (*Agarwal i wsp.*, 2021; *Bender Atik i wsp.*, 2018; *Esteves i wsp.*, 2021). Zatem ocena integralności i dojrzałości chromatyny plemników może być czynnikiem predykcyjnym w warunkach naturalnej koncepcji, jak i w sytuacji wykorzystania technik wspomaganą prokreacji, ponieważ – o czym wspomniano wcześniej – status chromatyny może mieć wpływ na proces zapłodnienia, rozwój zarodka i uzyskaniu ciąży i w konsekwencji w przypadku jego obniżenia może stać się przyczyną poronień (*Agarwal i wsp.*, 2020, 2021; *Carlini i wsp.*, 2017; *Cissen i wsp.*, 2016; *Esteves i wsp.*, 2021; *Gill i wsp.*, 2019; *Kazerooni i wsp.*, 2009; *Rodrigo*, 2019; *Selvam i wsp.*, 2021; *Softness i wsp.*, 2020; *Talebi i wsp.*, 2016; *Tsuribe i wsp.*, 2016; *Wang i wsp.*, 2020).

Obecnie uznaje się istnienie trzech mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie nacięć podwójnej helisy DNA: zaburzenia przebudowy chromatyny podczas spermiogenezy, „nieudaną” apoptozę plemników (ang. *abortive sperm apoptosis*) i stres oksydacyjny. Uważa się, że zaburzenia reorganizacji chromatyny plemników podczas spermiogenezy wiążą się z nieprawidłową jej protaminacją i zwiększeniem w niej zawartości histonów jądrowych, w efekcie dochodzi do obniżenia jej integralności manifestującej się obecnością podwójnych nacięć nici DNA, które nie są naprawiane wskutek upośledzenia procesu naprawczego i mają status przetrwałych nacięć DNA. Podwójne nacięcia nici DNA to również efekt „nieudanej” apoptozy plemników. Dotyczy on uszkodzonych komórek germinalnych/gamet, które nie do końca przeszły proces apoptozy, uniknęły bowiem eliminacji przez komórki Sertolego wchodzące w skład nabłonka

plemnikotwórczego. Aktywacja wykonawców apoptozy – kaspaz (proteazy cysteinowe) i w konsekwencji jądrowych endonukleaz prowadzi do pojawienia się w ejakulacie plemników z nacięciami DNA. Z kolei pojedyncze, a także podwójne nacięcia nici DNA powstają wskutek oksydacyjnego uszkodzenia DNA (np. w najądrzu), w wyniku którego powstaje np. 8-OHdG, o czym wspomniano już wcześniej. W efekcie dochodzi do rozerwania nici DNA i powstania pojedynczych jej pęknięć. Jednak w następstwie stresu oksydacyjnego ma miejsce także tworzenie się toksycznych produktów peroksydacji lipidów błonowych plemnika (np. MDA lub 4HNE [4-hydroksynonenal]), które mogą aktywować kaspazy i endonukleazy i w efekcie generować podwójne nacięcia DNA (*Agarwal i wsp.*, 2020, 2021; *Esteves i wsp.*, 2021; *Gill i wsp.*, 2020; *Softness i wsp.*, 2020; *Zhu i wsp.*, 2020).

Z przeglądu piśmiennictwa, w tym przeprowadzonych przez autorów metaanaliz, wynika, że wzrost odsetka plemników z nieprawidłowym statusem chromatyny wiąże się z istotnym zwiększeniem ryzyka RPL zarówno w przypadku naturalnej prokreacji, jak i wspomaganą medycznie. Wielu badaczy wykazało, że odsetek plemników z uszkodzoną chromatyną mężczyzn z par z historią RPL (grupa badana) był istotnie wyższy w porównaniu z grupą mężczyzn płodnych (grupa kontrolna). Autorzy stosują różne metody weryfikacji statusu chromatyny – oceniają zarówno fragmentację DNA plemników, jak i protaminację oraz kondensację ich chromatyny (*Carlini i wsp.*, 2016; *Haddock i wsp.*, 2021; *Khadem i wsp.*, 2014; *Klimczak i wsp.*, 2021; *Li i wsp.*, 2021; *McQueen i wsp.*, 2019; *Robinson i wsp.*, 2012; *Tan i wsp.*, 2018; *Yifu i wsp.*, 2020; *Zhao i wsp.*, 2014; *Zidi-Jrah i wsp.*, 2016).

Haddock i wsp. (2021) ujawnili 33,32 ± 0,57% plemników z pofragmentowanym DNA (test kometowy) w grupie badanej (vs. 14,87 ± 0,66%), z kolei inni autorzy wykazali 30,05 ± 6,3% (vs. 9,03 ± 2,9%), 18,8 ± 7,0% (vs. 12,8 ± 5,3%), 17,1% (vs. 10,2%) i 14,49 ± 6,09% (vs. 9,65 ± 3,66%) plemników TUNEL-pozytywnych z pęknięciami nici DNA (*Carlini i wsp.*, 2016; *Kamkar i wsp.*, 2018; *Talebi i wsp.*, 2016; *Zidi-Jrah i wsp.*, 2016), natomiast *Khadem i wsp.* (2014) zanotował aż 43,3% (vs. 16,7%) plemników z nieprawidłową dyspersją chromatyny (test SCD, ang. *sperm chromatin dispersion*), a *Kamkar i wsp.* (2018) 25,95 ± 10,20% (vs. 19,44 ± 7,62%) plemników z pofragmentowanym DNA (DFI, test SCSA [ang. *sperm chromatin structure assay*]). W nasieniu mężczyzn z par z RPL stwierdza się również istotnie wyższe odsetki plemników o obniżonej protaminacji (test z chromomycyną A3) (42,35 ± 13,12% vs. 23,03 ± 7,5%) (*Talebi i wsp.*, 2016) i ze zwiększoną zawartością histonów jądrowych (test z błękitem aniliny) (23,6% vs. 11,8%; 88,94 ± 2% vs. 73,60 ± 3%) (*Mohanty i wsp.*, 2016; *Zidi-Jrah i wsp.*, 2016).

Ciekawe analizy przeprowadzili *Zhu i wsp.* (2020). Badacze wykazali, że w grupie mężczyzn z par z RPL było istotnie więcej przypadków (42,3%) z wysokim poziomem uszkodzenia plemnikowej chromatyny (DFI >30%) w porównaniu z mężczyznami (13,1%) z par,

u których wykazano kliniczną ciężę w wyniku procedury *in vitro*. Potwierdza się, że wartość DFI >40% zdecydowanie zwiększa ryzyko poronienia. Za wartość prawidłową, która wiąże się z wysoką płodnością, uznaje się DFI od 1 do 15% (*Cheng i wsp.*, 2020; *Cho i wsp.*, 2017; *Esteves i wsp.*, 2021; *Evenson*, 2017; *Oleszczuk i wsp.*, 2016).

Nie zawsze jednak ujawnia się związek między statusem chromatyiny plemników a poronieniami. Wartość odsetka plemników z nieprawidłową chromatyną nie koniecznie może być czynnikiem ryzyka utraty ciąży (*Chen i wsp.*, 2020; *Green i wsp.*, 2020). Sugeruje się, że uszkodzenia DNA plemnika mogą być naprawiane przez komórkę jajową na poziomie tworzenia się przedjąra męskiego jeszcze przed replikacją ojcowskiego genomu i mogą być kontynuowane aż do osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty, co ma istotne znaczenie kliniczne podczas hodowli zarodków w warunkach *in vitro*. Stąd też można przypuszczać, że patomechanizm odpowiedzialny za poronienia może być powiązany z niepoprawieniem uszkodzeń nici DNA plemnika, które nie są tolerowane. Brak naprawy pęknięć DNA może uniemożliwić konieczną przebudowę chromatyiny męskiej gamety (usuwanie protamin i histonów jądrowych a wbudowywanie histonów somatycznych) i jej epigenetyczne przeprogramowanie. Kompetencje oocyty i jego dojrzałość będą decydowały o dalszych losach zarodka. Należy wspomnieć, że zdolności oocyty do naprawy uszkodzeń plemnikowego DNA istotnie się zmniejszają po 35. r.ż. kobiety (*Horta i wsp.*, 2020; *Jeřeta i wsp.*, 2020; *Khokhlova i wsp.*, 2020; *Kuhakulla i wsp.*, 2021).

■ Zaawansowany wiek mężczyzny

Nieodwracalnym, a przez to niebagatelnym czynnikiem wpływającym na sukces rozrodczy danej pary jest nie tylko wiek kobiety, ale także wiek mężczyzny. Badacze poszukują tzw. zaawansowanego wieku ojcowskiego (APA, ang. *advanced paternal age*), powyżej którego istnieje ryzyko niepowodzeń w rozrodzie, sugeruje się 35. lub 40. r.ż. (*Agarwal i wsp.*, 2016; *Alshahrani i wsp.*, 2014; *du Fossé i wsp.*, 2020; *Halvaei i wsp.*, 2020; *Harris i wsp.*, 2017; *Jaleel i Khan*, 2013; *Nybo Andersen i Urhoj*, 2017; *Piasecka i Gill*, 2021; *Rosiak i wsp.*, 2017a, 2017b, 2019; *Sharma i wsp.*, 2015; *Wang i wsp.*, 2017; *Wu i wsp.*, 2015).

Wraz z wiekiem mężczyzny obniżają się podstawowe parametry seminologiczne oraz rośnie poziom uszkodzenia chromatyiny plemnika (*Gill i wsp.*, 2019, 2020; *Piasecka i Gill*, 2021; *Rosiak i wsp.*, 2017a, 2019). Według *Stone i wsp.* (2013) wartość parametrów nasienia nie zmienia się do 34. r.ż., po czym dynamicznie spada, powodując wzrost niepowodzeń rozrodu niezależnie od wieku matki. Stwierdzono, że wiek negatywnie wpływa na objętość ejakulatu (>40. r.ż.), liczbę plemników (>50. r.ż.), ich morfologię (>40. r.ż.), ruchliwość (>35. r.ż. lub 43. r.ż.) i żywotność (>35. r.ż.) (*Jaleel i Khan*, 2013; *Molina i wsp.*, 2010; *Piasecka i Gill*, 2021; *Stone i wsp.*, 2013).

Proces starzenia powoduje również zmianę stężenia pierwiastków śladowych (wapń, cynk, siarka, miedź), fruktozy i aktywności α -glukozydazy obojętnej w płazmie nasienia (>45. r.ż.), co sugeruje dysfunkcję pęcherzyków nasiennych, prostaty i jądra (*Henkel i wsp.*, 2005; *Molina i wsp.*, 2010; *Nybo Andersen i Urhoj*, 2017). Nie ulega wątpliwości, że wymienione zaburzenia mogą obniżać zdolność plemników do zapłodnienia w warunkach naturalnej koncepcji. Większość doniesień wskazuje, że ryzyko niepłodności, a w następstwie konieczność zastosowania metod wspomaganego rozrodu wzrasta znacznie >40. r.ż. mężczyzny (*Agarwal i wsp.*, 2016; *du Fossé i wsp.*, 2020; *Mukhopadhyay i wsp.*, 2010; *Ramasamy i wsp.*, 2015a). Warto zwrócić uwagę, że w przypadku mężczyzn już >35. r.ż. szansa na uzyskanie naturalnej koncepcji u ich partnerek w ciągu 12 miesięcy była 2-krotnie niższa (vs. mężczyźni <25. r.ż.) (*Ramasamy i wsp.*, 2015a). Klinicznie wiąże się to m.in. z zaburzeniami zapłodnienia, rozwoju zarodka i dłuższym czasem oczekiwania na ciążę oraz ze zwiększonym ryzykiem poronienia (*du Fossé i wsp.*, 2020; *Eisenberg i Meldrum*, 2017; *Harris i wsp.*, 2017; *Jaleel i Khan*, 2013; *Johnson i wsp.*, 2015; *Nybo Andersen i Urhoj*, 2017; *Nybo Andersen i wsp.*, 2004; *Puscheck i Jeyendran*, 2007; *Ramasamy i wsp.*, 2015a; *Sharma i wsp.*, 2015; *Yatsenko i Turek*, 2018).

Du Fossé i wsp. (2020), którzy dokonali przeglądu piśmiennictwa i przeprowadzili metaanalizę danych, wykazali, iż ryzyko poronień spontanicznych rośnie ponad 1,2-krotnie, gdy mężczyzna w momencie poczęcia dziecka miał >40. r.ż., prawie 1,5-krotnie, gdy miał >45. r.ż. w porównaniu z mężczyznami w wieku 25–29 lat. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (*De La Rochebrochard i Thonneau*, 2002; *De La Rochebrochard i wsp.*, 2003), którzy stwierdzili prawie 2-krotnie wyższe ryzyko poronień, gdy mężczyzna był >40. r.ż. (vs. mężczyźni w wieku 20–29 lat), w szczególności gdy kobieta była ≥ 35 . r.ż. Z kolei *Slama i wsp.* (2005) ujawnili, że ryzyko poronień spontanicznych, niezależnie od wieku kobiety w I trymestrze ciąży, wzrastało 1,27-krotnie, gdy mężczyźni byli ≥ 35 . r.ż. w porównaniu z mężczyznami <35. r.ż. Jednak w grupie kobiet <30. r.ż. ryzyko to było ok. 1,6-krotnie wyższe. Według tych samych autorów ryzyko poronień u kobiet, których partnerzy w chwili poczęcia potomstwa mieli 40, 45, i 50 lat, zdecydowanie wzrastało i wynosiło odpowiednio 1,58, 1,74, 1,90.

Uważa się, że patomechanizm poronień związanych z wiekiem mężczyzny może być spowodowany zmniejszeniem integralności jądrowego DNA plemników, ponieważ wiek partnera może być czynnikiem ryzyka zaburzeń reorganizacji materiału genetycznego komórek germinalnych (*Rosiak i wsp.*, 2017a, 2019; *Zhu i wsp.*, 2020). Potwierdzają to wyniki badań, w których wykazano korelację między wiekiem mężczyzny a fragmentacją DNA plemników i w efekcie wzrost częstości RPL (*Carlini i wsp.*, 2017; *Zhu i wsp.*, 2020). Jednak wpływ wieku mężczyzny na ryzyko poronień jest niejednoznaczny, nie zawsze bowiem obserwuje się związek między wiekiem partnera

a poronieniami (*Dain i wsp., 2011; Ferreira i wsp., 2010*), co więcej może być on zależny od standardowych parametrów seminologicznych (*Ferreira i wsp., 2010*). *Ferreira i wsp. (2010)* donoszą, że w przypadku mężczyzn z oligozoospermia wiek badanych miał wpływ na odsetek implantacji i uzyskanych ciąży; u par z oligozoospermia szansa na uzyskanie ciąży zmniejszała się o 5% na każdy rok życia partnera. Zależności tych autorzy nie obserwowali w grupie mężczyzn z normozoospermia.

Nie można pominąć faktu, że wiek ojca może mieć wpływ również na organogenezę i w następstwie powodować wady wrodzone u potomstwa (*Janeczko i wsp., 2020; Nybo Andersen i Olsen, 2011; Rosiak i wsp., 2017b; Sharma i wsp., 2015; Taylor i wsp., 2019; Yatsenko i Turek, 2018*). Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że częstość przetok tchawiczo-przetykowych oraz achondroplazji u urodzonych dzieci była odpowiednio 2,55-krotnie i 3,48-krotnie wyższa, gdy mężczyzna w chwili poczęcia miał >30. r.ż. w porównaniu z mężczyznami <30. r.ż. Z kolei częstość występowania ubytków przegrody międzykomorowej i przedsionkowej wzrastała odpowiednio 3,63-krotnie oraz 1,95-krotnie, gdy mężczyzna w chwili poczęcia miał >35. r.ż. (*Piasecka i Gill, 2021; Sharma i wsp., 2015*).

■ Podsumowanie

Wiele opublikowanych danych dowodzi, że rola czynnika męskiego w poronieniach nawracających, przede wszystkim w przypadkach poronień idiopatycznych powinna być szczególnie brana pod uwagę i niebagatelizowana, zwłaszcza gdy niepłodne pary kwalifikowane są do zapłodnienia pozaustrojowego. Do najczęstszych i najlepiej poznanych czynników ryzyka poronień należy czynnik genetyczny, który związany jest nie tylko z klasycznymi aberracjami liczbowymi chromosomów autosomalnych lub płciowych i aberracjami strukturalnymi (np. translokacje wzajemne lub Robertsonowskie) uniemożliwiającymi prawidłowy rozwój zarodka/płodni i utrzymanie ciąży, ale także z polimorfizmami genów uczestniczących we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (antygen HLA-G, HLA-C, receptory KIR), która w warunkach prawidłowych od momentu dostania się plemników do dróg rodnych kobiety jest modulowana i w konsekwencji ma miejsce tolerancja układu odpornościowego kobiety wobec semiallogenicznego zarodka. Inne czynniki genetyczne to mutacje i polimorfizmy genów odpowiedzialnych za trombofilie, mikrodelecie i polimorfizmy stwierdzane w długim ramieniu chromosomu Y, a także zaburzenia epigenetyczne związane z nieprawidłowym poziomem metylacji piętnowanych genów plemnika (zaburzenia imprintingu genomowego). Jeszcze inne dyskutowane i sugerowane czynniki ryzyka poronień to obniżona jakość nasienia, często powiązana z aberracjami chromosomów i ze stresem oksydacyjnym przyczyniającym się m.in. do nieprawidłowego statusu chromatyny męskich komórek rozrodczych. Ponadto, zaawansowany

wiek mężczyzny (>35 r.ż. lub >40 r.ż.), który często jest niedoceniany, szczególnie wraz z zaawansowanym wiekiem kobiety (>35 r.ż.) może powodować utratę ciąży.

Mając na uwadze wymienione powyżej czynniki ryzyka poronień należy szczególną uwagę zwrócić na weryfikację nosicielstwa zaburzeń genetycznych i istotnych biomarkerów jakości nasienia (np. status chromatyny, markery stanu zapalnego). Ponadto, nie można bagatelizować oceny strukturalno-funkcjonalnej męskich komórek rozrodczych, bowiem w przypadkach drastycznych ich nieprawidłowości można spodziewać się podłoża genetycznego, które może być przyczyną braku koncepcji bądź nawracających poronień. Uwaga również powinna być zwrócona na styl życia partnerów, gdyż czynniki środowiskowe mają swój istotny wpływ na jakość gamet.

Należy jednak podkreślić, że wyniki wielu autorów dotyczące etiologii poronień często są niezgodne i niejednoznaczne, co może być związane z zastosowaniem różnych, nie zawsze dostępnych metod badawczych, trudnościami w interpretacji uzyskanych danych i z ich potencjalnym znaczeniem klinicznym. Ponadto, ujawnienie jednoznacznej przyczyny poronień nie zawsze jest możliwe ze względu na różnorodność przypadków klinicznych uwarunkowanych zarówno czynnikiem żeńskim jak i męskim. Stąd też istnieje ciągła potrzeba prowadzenia dalszych badań, szczególnie randomizowanych na dużej liczbie par, również w celu opracowania nowych, opartych na dowodach medycznych algorytmów diagnostyczno-terapeutycznych uwzględniających udział czynnika męskiego w poronieniach.

■ Piśmiennictwo

- Absalan F., Ghannadi A., Kazerooni M., Parifar R., Jamalzadeh F., Amir S.: Value of sperm chromatin dispersion atest in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet.* 2012, 29(1), 11–14. doi: 10.1007/s10815-011-9647-0. PMID: 22009642.
- Abur U., Gunes S., Asci R., Altundag E., Akar O.S., Ayas B. i wsp.: Chromosomal and Y-chromosome microdeletion analysis in 1,300 infertile males and the fertility outcome of patients with AZFc microdeletions. *Andrologia.* 2019, 51(11), 1–8. doi: 10.1111/and.13402. PMID: 31650616.
- Agarwal A., Barbároşie 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.
- Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho C.L., Henkel R., Vij S. i wsp.: Male infertility. *Lancet.* 2021, 397(10271), 319–333. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2. PMID: 33308486.
- Agarwal A., Majzoub A.: Role of Antioxidants in Assisted Reproductive Techniques. *World J Mens Health.* 2017, 35(2), 77–93. doi: 10.5534/wjmh.2017.35.2.77. PMID: 28497913.
- Agarwal A., Majzoub A., Esteves S.C., Ko E., Ramasamy R., Zini A.: Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol.* 2016, 5(6), 935–950. doi: 10.21037/tau.2016.10.03. PMID: 28078226.
- Agarwal A., Parekh N., Selvam M.K.P., Henkel R., Shah R., Homa S.T. i wsp.: Male oxidative stress infertility (MOSI): Proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *World J Mens Health.* 2019, 37(3), 296–312. doi: 10.5534/wjmh.190055. PMID: 31081299.

- Ahangari N., Doosti M., Mousavifar N., Attaran M., Shahrokhzadeh S., Memarpour S. *i wsp.*: Hereditary thrombophilia genetic variants in recurrent pregnancy loss. *Arch Gynecol Obstet.* 2019, 300(3), 777–782. doi: 10.1007/s00404-019-05224-7. PMID: 31317253.
- Ahmadi H., Mirfakhraie R., Irani S.: The relation between Y chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Tehran Univ Med J.* 2018, 75(10), 730–737.
- Ahmadi S., Bashiri R., Ghadiri-Anari A., Nadjarzadeh A.: Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J Reprod Biomed.* 2016, 14(12), 729–736. PMID: 28066832.
- Aitken R.J., Baker M.A., Sawyer D.: Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online.* 2003, 7(1), 65–70. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61730-0. PMID: 12930576.
- 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.
- Aitken R.J., Drevet J.R.: The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. *Antioxidants.* 2020, 9(2). doi: 10.3390/antiox9020111. PMID: 32012712.
- Andreotti J.P., Paiva A.E., Prazeres P.H.D.M., Guerra D.A.P., Silva W.N., Vaz R.S. *i wsp.*: The role of natural killer cells in the uterine microenvironment during pregnancy. *Cell Mol Immunol.* 2018, 15(11), 941–943. doi: 10.1038/s41423-018-0023-1. PMID: 29572543.
- Aldrich C.L., Stephenson M.D., Karrison T., Odem R.R., Branch D.W., Scott J.R. *i wsp.*: HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod.* 2001, 7(12), 1167–1172. doi: 10.1093/molehr/7.12.1167. PMID: 11719594.
- Aleksandru D., Klimczak A.M., Garcia Velasco J.A., Pirtea P., Franasiek J.M.: Immunologic causes and thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2021, 115(3), 561–566. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.01.017.
- Alibakhshi R., Nejati P., Hamani S., Mir-Ahadi N., Jalilian N.: Cytogenetic analysis of 570 couples with recurrent pregnancy loss: Reporting 11 years of experience. *J Hum Reprod Sci.* 2020, 13(3), 216–220. doi: 10.4103/jhrs.JHRS_138_19. PMID: 33311908.
- Almesned R.K., Alsuhailani S.S., Alali H.J., Qubbaj W.A., Al Hathal N.K.: Male Infertility in Robertsonian Translocation: A Case Report. *Am J Case Rep.* 2020, 21, e921616. doi: 10.12659/AJCR.921616. PMID: 32413022.
- Alshahrani S., Agarwal A., Assidi M., Abuzenadah A.M., Durairajanayagam D., Ayaz A. *i wsp.*: Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014, 12(1), 1–9. doi: 10.1186/1477-7827-12-103. PMID: 25410314.
- Amodio G., Canti V., Maggio L., Rosa S., Castiglioni M.T., Rovere-Querini P. *i wsp.*: Association of genetic variants in the 3'UTR of HLA-G and the Interaction with Its Receptors: Where to Intervene for Cancer Immunotherapy? *Int J Mol Sci.* 2020, 21(22), 8678. doi: 10.3390/ijms21228678. PMID: 33213057.
- Barati E., Nikzad H., Karimian M.: Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mole Life Sci.* 2020, 77(1), 93–113. doi: 10.1007/s00018-019-03253-8. PMID: 31377843.
- Barut M.U., Bozkurt M., Kahraman M., Yıldırım E., İmirzalioglu N., Kubar A. *i wsp.*: Thrombophilia and recurrent pregnancy loss: The enigma continues. *Med Sci Monit.* 2018, 24, 4288–4294. doi: 10.12659/MSM.908832. PMID: 29932168.
- Baskaran S., Finelli R., Agarwal A., Henkel R.: Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane? *Andrologia.* 2021, 53(1). doi: 10.1111/and.13577. PMID: 32271474.
- Bellver J., Meseguer M., Muriel L., García-Herrero S., Barreto M.A., Garda A.L. *i wsp.*: Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Hum Reprod.* 2010, 25(7), 1713–1721. doi: 10.1093/humrep/deq098. PMID: 20501469.
- Bender Atik R., Christiansen O.B., Elson J., Kolte A.M., Lewis S., Middeldorp S. *i wsp.*: ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open.* 2018, 2018(2), hoy004. doi: 10.1093/hropen/hoy004. PMID: 31486805.
- Bhattacharya S.M.: Association of various sperm parameters with unexplained repeated early pregnancy loss-which is most important? *Int Urol Nephrol.* 2008, 40(2), 391–395. doi: 10.1007/s11255-007-9282-y. PMID: 17899427.
- Boogaard E. van den, Cohn D.M., Korevaar J.C., Dawood F., Vissenberg R., Middeldorp S. *i wsp.*: Number and sequence of preceding miscarriages and maternal age for the prediction of antiphospholipid syndrome in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2013, 99(1), 188–192. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.002. PMID: 23043688.
- Brahem S., Mehdi M., Landolsi H., Mougou S., Elghezal H., Saad A.: Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology.* 2011, 78(4), 792–796. https://doi.org/10.1016/j.urolgy.2011.05.049. PMID: 21813165.
- Cardoso J.P., Cocuzza M., Elterman D.: Optimizing male fertility: oxidative stress and the use of antioxidants. *World J Urol.* 2019, 37, 1029–1034. doi: 10.1007/s00345-019-02656-3. PMID: 30719570.
- Carlini T., Paoli D., Pelloni M., Faja F., Dal Lago A., Lombardo F. *i wsp.*: Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online.* 2017, 34(1), 58–65. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.09.014. PMID: 27838218.
- Carosella E.D., Favier B., Rouas-Freiss N., Moreau P., Lemaoult J.: Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood.* 2008, 111(10), 4862–4870. doi: 10.1182/blood-2007-12-127662. PMID: 18334671.
- Carrell D.T., Liu L.: Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities, of spermiogenesis. *J Androl.* 2001, 22(4), 604–610. doi: 10.1002/j.1939-4640.2001.tb02220.x. PMID: 11451357.
- Carrell D.T., Liu L., Peterson C.M., Jones K.P., Hatasaka H.H., Erickson L. *i wsp.*: Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003, 49(1), 49–55. doi: 10.1080/01485010290099390. PMID: 12647778.
- Carrell D.T., Nyboe Andersen A., Lamb D.J.: The need to improve patient care through discriminate use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and improved understanding of spermatozoa, oocyte and embryo biology. *Andrology.* 2015, 3(2), 143–146. doi: 10.1111/andr.12034.
- 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, 52. doi.org/10.1186/s13048-020-00658-z. PMID: 32359369.
- Cheng H., Han M., Ding J., Wang F., Wang G., Shen L. *i wsp.*: Importance of a semen analysis report for determining the relationship between SCSA sperm DNA fragmentation index and assisted re-productive technology pregnancy rate. *Reprod. Biol.* 2020, 20, 460–464. doi: 10.1016/j.repbio.2019.09.002. PMID: 32798137.
- Cheung S., Parrella A., Rosenwaks Z., Palermo G.D.: Genetic and epigenetic profiling of the infertile male. *PLoS One.* 2019, 14(3), e0214275. doi: 10.1371/journal.pone.0214275. PMID: 30897172.
- Cho C.L., Agarwal A.: Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol.* 2018, 16(1), 21–34. doi: 10.1016/j.aju.2017.11.002. PMID: 29713533.
- Cho C.L., Agarwal A., Majzoub A., Esteves S.C.: A single cut-off value of sperm DNA fragmentation testing does not fit all. *Transl Androl Urol.* 2017, 6(Suppl 4), S501–S503. doi: 10.21037/tau.2017.08.12. PMID: 29082949.
- Cissen M., Van Wely M., Scholten I., Mansell S., De Bruin J.P., Mol B.W. *i wsp.*: Measuring sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically

- assisted reproduction: A systematic review and meta analysis. PLoS ONE. 2016, 11(11). doi: 10.1371/journal.pone.0165125. PMID: 27832085.
- Craenmehr M.H., Haasnoot G.W., Drabbels J.J., Spruyt-Gerritse M.J., Cao M., van der Keur C. *i wsp.*: Soluble HLA-G levels in seminal plasma are associated with HLA-G 3'UTR genotypes and haplotypes. HLA. 2019a, 94(4), 339–346. doi: 10.1111/tan.13628. PMID: 31321883.
- Craenmehr M.H., Nederlof I., Cao M., Drabbels J.J., Spruyt-Gerritse M.J., Anholts J.D. *i wsp.*: Increased HLA-G expression in term placenta of women with a history of recurrent miscarriage despite their genetic predisposition to decreased HLA-G levels. Int J Mol Sci. 2019b, 20(3). doi: 10.3390/ijms20030625. PMID: 30717132.
- Dahl M., Djurisic S., Hviid T.V.: The many faces of human leukocyte antigen-G: relevance to the fate of pregnancy. J Immunol Res. 2014a, 591489. doi: 10.1155/2014/591489. PMID: 24741608.
- Dahl M., Hviid T.V.: Human leukocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. Hum Reprod Update. 2012, 18(1):92-109. doi: 10.1093/humupd/dmr043. PMID: 22114131.
- Dahl M., Perin T.L., Djurisic S., Rasmussen M., Ohlsson J., Buus S., Lindhard A., Hviid T.V.: Soluble human leukocyte antigen-G in seminal plasma is associated with HLA-G genotype: possible implications for fertility success. Am J Reprod Immunol. 2014b, 72(1), 89–105. doi: 10.1111/aji.12251. PMID: 24735563.
- Dain L., Auslander R., Dirnfeld M.: The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. Fertil Steril. 2011, 95(1), 1–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.029. PMID: 20932518.
- De Galan-Roosen A.E.M., Kuijpers J.C., Rosendaal F.R., Steegers E.A., Van Beers W.A., Ponjee G.A. *i wsp.*: Maternal and paternal thrombophilia: Risk factors for perinatal mortality. BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2005, 112(3), 306–311. doi: 10.1111/j.1471-0528.2004.00435.x.
- De La Rochebrochard E., McElreavey K., Thonneau P.: Paternal Age over 40 Years: The "Amber Light" in the Reproductive Life of Men? J Androl. 2003, 24(4), 459–465. doi: 10.1002/j.1939-4640.2003.tb02694.x. PMID: 12826682.
- De La Rochebrochard E., Thonneau P.: Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage: Results of a multicentre European study. Hum Reprod. 2002, 17(6), 1649–1656. doi: 10.1093/humrep/17.6.1649. PMID: 12042293.
- Deshmukh H., Way S.S.: Immunological Basis for Recurrent Fetal Loss and Pregnancy Complications. Annu Rev Pathol. 2019, 14, 185–210. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012743. PMID: 30183507.
- Dewan S., Puscheck E.E., Coulam C.B., Wilcox A.J., Jeyendran R.S.: Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2006, 85(2), 441–445. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.035. PMID: 16595224.
- Dhanoo J.K., Mukhopadhyay C.S., Arora J.S.: Y-chromosomal genes affecting male fertility: A review. Vet World. 2016, 9(7), 783–791. doi: 10.14202/vetworld.2016.783-791. PMID: 27536043.
- Dhawan V., Kumar M., Dada R.: Effect of Sperm Molecular Factors, Oxidative Damage and Transcripts in Childhood Disorders. J Child Dev Disord. 2017, 3(01), 2–4. doi: 10.4172/2472-1786.100044.
- Dhawan V., Kumar M., Deka D., Malhotra N., Singh N., Dadhwal V. *i wsp.*: Paternal factors and embryonic development: Role in recurrent pregnancy loss. Andrologia. 2019, 51(1), 1–8. doi: 10.1111/and.13171. PMID: 30324700.
- du Fossé N.A., van der Hoorn M.L., van Lith J.M., le Cessie S., Lashley E.E.: Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2020, 26(5), 650–669. doi: 10.1093/humupd/dmaa010. PMID: 32358607.
- Dutta S., Majzoub A., Agarwal A.: Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. Arab J Urol. 2019, 17(2), 87–97. doi: 10.1080/2090598X.2019.1599624. PMID: 31285919.
- Dziuba U.: Genetyczne przyczyny niepłodności. Med Rodz. 2017, 20(3). doi: 10.25121/mr.2017.20.3.198.
- Eisenberg M.L., Meldrum D.: Effects of age on fertility and sexual function. Fertil Steril. 2017, 107(2), 301–304. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.018. PMID: 28160919.
- Eisenberg M.L., Sapra K.J., Kim S.D., Chen Z., Buck Louis G.M.: Semen quality and pregnancy loss in a contemporary cohort of couples recruited before conception: Data from the LIFE Study. Fertil Steril. 2017, 108(4), 613–619. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.07.008. PMID: 28863939.
- Elbaşı M.O., Tulunay A., Karagözoğlu H., Kahraman S., Ekşioğlu-Demiralp E.: Maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and paternal human leukocyte antigen ligands in recurrent pregnancy loss cases in Turkey. Clin Exp Reprod Med. 2020, 7(2), 122–129. doi: 10.5653/cerm.2019.03223. PMID: 32450627.
- Elbracht M., Mackay D., Begemann M., Kagan K.O., Eggermann T.: Disturbed genomic imprinting and its relevance for human reproduction: causes and clinical consequences. Hum Reprod Update. 2020, 26(2), 197–213. doi: 10.1093/humupd/dmz045. PMID: 32068234.
- El Hachem H., Crepau V., May-Panloup P., Descamps P., Legendre G., Bouet P.E.: Recurrent pregnancy loss: Current perspectives. Int J Womens Health. 2017, 9, 331–345. doi: 10.2147/IJWH.S100817. PMID: 28553146.
- El Hajj N., Zechner U., Schneider E., Tresch A., Gromoll J., Hahn T. *i wsp.*: Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. Sex Dev. 2011, 5(2), 60–69. doi: 10.1159/000323806. PMID: 21293114.
- ESHRE. Recurrent pregnancy loss. Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology. European Society of Human Reproduction and Embryology. 2017. <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Recurrent-pregnancy-loss>. data wejścia 12.12.2020 r.
- Eskicioğlu F., Özdemir A.T., Özdemir R.B., Turan G.A., Akan Z., Hasdemir S.P.: The association of HLA-G and immune markers in recurrent miscarriages. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016, 29(18), 3056–3060. doi: 10.3109/14767058.2015.1114085. PMID: 26513380.
- Eslami M.M., Khalili M., Soufizomorrod M., Abroun S., Razi B.: Factor V Leiden 1691G > A mutation and the risk of recurrent pregnancy loss (RPL): systematic review and meta-analysis. Thromb J. 2020, 18, 11. doi: 10.1186/s12959-020-00224-z. PMID: 32595420.
- Esquerré-Lamare C., Walschaerts M., Chansel Debordeaux L., Moreau J., Bretelle F., Isus Francois *i wsp.*: Sperm aneuploidy and DNA fragmentation in unexplained recurrent pregnancy loss: a multicenter case-control study. Basic Clin Androl. 2018, 28:4. doi: 10.1186/s12610-018-0070-6. PMID: 29619224.
- Esteves S.C., Zini A., Coward R.M., Evenson D.P., Gosálvez J., Lewis S.E. *i wsp.*: Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. Andrologia. 2021, 53(2). doi: 10.1111/and.13874.
- 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, S495–S500. doi: 10.21037/tau.2017.07.20. PMID: 32798137.
- Fan H.T., Zhang M., Zhan P., Yang X., Tian W.J., Li R.W.: Structural chromosomal abnormalities in couples in cases of recurrent spontaneous abortions in Jilin Province, China. Gen Mol Res. 2016, 15(1). doi: 10.4238/gmr.15017443. PMID: 26909916.
- Fan W., Huang Z., Li S., Xiao Z.: The HLA-G 14-bp polymorphism and recurrent implantation failure: a meta-analysis. J Assist Reprod Genet. 2017, 34(11), 1559–1565. doi: 10.1007/s10815-017-0994-3. PMID: 28707147.
- Fan W., Li S., Huang Z., Chen Q.: Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: a meta-analysis of non-family-based studies. J Assist Reprod Genet. 2014, 31(2), 173–184. doi: 10.1007/s10815-013-0155-2. PMID: 24346507.
- Ferreira R.C., de Almeida Ferreira Braga D.P., de Souza Bonetti T.C., Pasqualotto F.F., Iaconelli A., Borges E.: Negative influence of paternal age on clinical intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in oligozoospermic patients. Fertil Steril. 2010, 93(6), 1870–1874. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.043. PMID: 19409557.
- Ford H.B., Schust D.J.: Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. Rev Obstet Gynecol. 2009, 2(2), 76–83. PMID: 19609401.
- Fraczek M., Kurpisz M.: Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: Potential inflammatory markers in semen. Folia Histochem Cytobiol. 2015, 53(3), 201–217. doi: 10.5603/FHC.a2015.0019. PMID: 26306512.
- Fu B., Zhou Y., Ni X., Tong X., Xu X., Dong Z., *i wsp.*: Natural Killer Cells Promote Fetal Development through the Secretion of Growth-Promoting Factors. Immunity. 2017, 47(6), 1100–1113.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.018. PMID: 29262349.

- Ghazaey S., Keify F., Mirzaei F., Maleki M., Tootian S., Ahadian M. i wsp.: Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions in Northeastern Iran. *Int J Fertil Steril*. 2015, 9(1), 47–54. doi: 10.22074/ijfs.2015.4208. PMID: 25918592.
- Ghorbian S., Saliminejad K., Sadeghi M.R., Javadi G.H., Kamali K., Amirjannati N.: The association between Y Chromosome microdeletion and recurrent pregnancy loss. *Iran Red Crescent Med J*. 2012, 14(6):358–362 PMID: 22924114.
- Gil-Villa A.M., Cardona-Maya W., Agarwal A., Sharma R., Cadavid Á.: Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? *Fertil Steril*. 2009, 92(2), 565–571. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1715. PMID: 18829003.
- Gil-Villa A.M., Cardona-Maya W., Agarwal A., Sharma R., Cadavid Á.: Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2010, 94(4), 1465–1472. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.042. PMID: 19540481.
- Gill K., Jakubik-Uljasz J., Rosiak-Gill A., Grabowska M., Matuszewski M., Piasecka M.: Male aging as a causative factor of detrimental changes in human conventional semen parameters and sperm DNA integrity. *Aging Male*. 2020, 23(5), 1321–1332. doi: 10.1080/13685538.2020.1765330. PMID: 32425138.
- Gill K., Jakubik J., Rosiak-Gill A., Kups M., Lukaszuk M., Piasecka 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*. 2019, 16(11). doi: 10.3390/ijerph16112004. PMID: 31195656.
- 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.
- Gunes S., Esteves S.C.: Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia*. 2021 53(1), e13586. doi: 10.1111/and.13586. PMID: 32314821.
- Haddock L., Gordon S., Lewis S.E., Larsen P., Shehata A., Shehata H.: Sperm DNA fragmentation is a novel biomarker for early pregnancy loss. *Reprod Biomed Online*. 2021, 42(1), 175–184. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.09.016. PMID: 33082108.
- 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.
- Harris B.S., Bishop K.C., Kemeny H.R., Walker J.S., Rhee E., Kuller J.A.: Risk factors for birth defects. *Obstet Gynecol Surv*. 2017, 72(2), 123–135. doi: 10.1097/OGX.0000000000000405. PMID: 28218773.
- Havrylyuk A., Chopyak V., Nakonechnyyi A., Kurpisz M.: Nowe aspekty niepłodności partnerskiej:czynnik męski. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015, 12, 69, 1228–1238. doi: 10.5604/17322693.1179651. PMID: 26561850.
- Henkel R., Maass G., Schuppe H.C., Jung A., Schubert J., Schill W.B.: Molecular aspects of declining sperm motility in older men. *Fertil Steril*. 2005, 84(5), 1430–1437. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.020.
- Hiby S.E., Apps R., Sharkey A.M., Farrell L.E., Gardner L., Mulder A. i wsp.: Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest*. 2010, 120(11), 4102–2110. doi: 10.1172/JCI43998. PMID: 20972337.
- Hiby S.E., Regan L., Lo W., Farrell L., Carrington M., i wsp.: Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2008, 23(4), 972–976. doi: 10.1093/humrep/den011. PMID: 18263639.
- Hodes-Wertz B., Grifo J., Ghadir S., Kaplan B., Laskin C.A., Glassner M., Munné S.: Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril*. 2012, 98(3), 675–680. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.025. PMID: 22683012.
- 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*. 2019, 10(3), 2019; 6–9. doi: 10.3390/genes10030236. PMID: 30893955.
- Horta F., Catt S., Ramachandran P., Vollenhoven B., Temple-Smith P.: Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Hum Reprod*. 2020, 35(3), 529–544. doi: 10.1093/humrep/dez308. PMID: 32108237.
- Hwang K., Weedin J.W., Lamb D.J.: The use of fluorescent in situ hybridization in male infertility. *Ther Adv Urol*. 2010, 2(4), 157–169. doi: 10.1177/1756287210373758. PMID: 21789092.
- Hviid T.V.: Human Leukocyte Antigen-G Within the Male Reproductive System: Implications for Reproduction. W: *The Male Role in Pregnancy Loss and Embryo Implantation Failure*. Red. Richard Bronson. Springer International Publishing AG, Cham Switzerland 2015, 171–190.
- Ibrahim Y., Hotaling J.: Sperm Epigenetics and Its Impact on Male Fertility, Pregnancy Loss, and Somatic Health of Future Offsprings. *Semin Reprod Med*. 2018, 36(3–04), 233–239. doi: 10.1055/s-0038-1677047. PMID: 30866010.
- Ishida M., Moore G.E.: The role of imprinted genes in humans. *Mol Aspects Med*. 2013 34(4), 826–840. doi: 10.1016/j.mam.2012.06.009. PMID: 22771538.
- Ibrahim Y., Johnstone E.: The male contribution to recurrent pregnancy loss. *Trans Androl Urol*. 2018, 7(3), S317–S327. doi: 10.21037/tau.2018.05.14. PMID: 30159238.
- Imam S.N., Shamsi M.B., Kumar K., Deka D., Dada R.: Idiopathic recurrent pregnancy loss: Role of paternal factors; a pilot study. *J Reprod Infertil*. 2011, 12(4), 267–276. PMID: 23926513.
- Jaleel R., Khan A.: Paternal factors in spontaneous first trimester miscarriage. *Pak J Med Sci*. 2013, 29(3), 748–752. doi: 10.12669/pjms.293.3388. PMID: 24353621.
- Janeczko D., Hołowczuk M., Orzeł A., Klatka B., Semczuk A.: Paternal age is affected by genetic abnormalities, perinatal complications and mental health of the offspring. *Biomed Rep*. 2020, 12(3), 83–88. doi: 10.3892/br.2019.1266. PMID: 32042416.
- Jayasena C.N., Radia U.K., Figueiredo M., Revill L.F., Dimakopoulou A., Osagie M. i wsp.: Reduced testicular steroidogenesis and increased semen oxidative stress in Male partners as novel markers of recurrent miscarriage. *Clin Chem*. 2019, 65(1), 161–169. doi: 10.1373/clinchem.2018.289348. PMID: 30602480.
- Jeřeta M., Myšková M., Žáková J., Crha I., Crha K., Chmelikova E., Kistanova E., Ventruba P.: Can oocytes repair fragmented DNA of spermatozoa? *Med J Cell Biol*. 2020, 8(2), 73–77.
- Jenkins T.G., Aston K.I., Pflueger C., Cairns B.R., Carrell D.T.: Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet*. 2014, 10(7), e1004458. doi: 10.1371/journal.pgen.1004458. PMID: 25010591.
- Jivraj S., Rai R., Underwood J., Regan L.: Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2006, 21(5), 1161–1165. doi: 10.1093/humrep/dei466. PMID: 16431900.
- Johnson S.L., Dunleavy J., Gemmell N.J., Nakagawa S.: Consistent age-dependent declines in human semen quality: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2015, 19, 22–33. doi: 10.1016/j.arr.2014.10.007. PMID: 25462195.
- Kalotra V., Lall M., Verma I.C., Kaur A., Kaur A.: The HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism and its association with soluble HLA-G levels in women with recurrent miscarriages. *HLA*. 2018, 91(3), 167–174. doi: 10.1111/tan.13198. PMID: 29280596.
- Kamkar N., Ramezanali F., Sabbaghian M.: The relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss. *Reprod Biol*. 2018, 18(4), 330–335. doi: 10.1016/j.repbio.2018.11.002. PMID: 30448091.
- Kar B., Sivamani S., Kundavi S., Varma T.R.: The Importance of Cytogenetics and Associated Molecular Techniques in the Management of Patients Carrying Robertsonian Translocation and Their Pregnancy Outcome by Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Obstet Gynaecol India*. 2018, 68(2), 93–97. doi: 10.1007/s13224-017-0999-y. PMID: 29662277.
- Karaer A., Karaer K., Ozaksit G., Ceylaner S., Percin E.F.: Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol*. 2008, 199(6), 662.e1–662.e5. doi: 10.1016/j.ajog.2008.06.013. PMID: 18822402.
- Kayser M.: Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet*. 2017, 136(5), 621–635. doi: 10.1007/s00439-017-1776-9. PMID: 28315050.

- Kazerooni T., Asadi N., Jadid L., Kazerooni M., Ghanadi A., Ghaffarpasand F. *i wsp.*: Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet.* 2009, 26(11–12), 591–596. doi: 10.1007/s10815-009-9361-3. PMID: 19894107.
- Khadem N., Poorhoseyni A., Jalali M., Akbary A., Heydari S.T.: Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia.* 2014, 46(2), 126–130. doi: 10.1111/and.12056. PMID: 23278374.
- Khambata K., Raut S., Deshpande S., Mohan S., Sonawane S., Gaonkar R. *i wsp.*: DNA methylation defects in spermatozoa of male partners from couples experiencing recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2021 Jan 1;36(1):48–60. doi: 10.1093/humrep/deaa278. PMID: 33319906.
- Khokhlova E.V., Fesenko Z.S., Sopova J.V., Leonova E.I.: Features of DNA Repair in the Early Stages of Mammalian Embryonic Development. *Genes (Basel).* 2020, 11(10), 1138. doi: 10.3390/genes11101138. PMID: 32992616.
- Kim J.W., Lee W.S., Yoon T.K., Seok H.H., Cho J.H., Kim Y.S. *i wsp.*: Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC Med Genet.* 2010, 11(1), 153. doi: 10.1186/1471-2350-11-153. PMID: 21044350.
- Klimczak A.M., Patel D.P., Hotaling J.M., Scott R.T. Jr.: Role of the sperm, oocyte, and embryo in recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2021, 115(3), 533–537. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.12.005. PMID: 33712098.
- Klimkiewicz-Wojciechowska G., Lech-Marańda E.: Rola ludzkiego antygenu leukocytarnego G w procesach immunologicznych i jego znaczenie kliniczne. *Hematologia.* 2012, 3(4), 327–342.
- Koc A., Kirbiyik O., Kutbay Y.B., Ozyilmaz B., Ozdemir T.R., Kaya O.O. *i wsp.*: Fetal HLA-Galleles and their effect on miscarriage. *Adv Clin Exp Med.* 2018, 27(9), 1233–1237. doi: 10.17219/acem/69692. PMID: 29809322.
- Kohn T.P., Kohn J.R., Darilek S., Ramasamy R., Lipshultz L.: Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J Assist Reprod Genet.* 2016, 3(5), 571–576. doi: 10.1007/s10815-016-0702-8. PMID: 27020275.
- Krausz C., Casamonti E.: Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet.* 2017, 136(5), 637–655. doi: 10.1007/s00439-017-1793-8. PMID: 28456834.
- Kurzawińska G., Seremak-Mrozikiewicz A., Drews K., Barlik M., Mrozikiewicz P.: Trombofilia wrodzona jako przyczyna poronień nawracających w I trymestrze ciąży. *Ginekolog Pol.* 2009, 80(9), 657–663.
- Kuchakulla M., Narasimman M., Khodamoradi K., Khosravizadeh Z., Ramasamy R.: How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. *Andrologia.* 2021, 53(1), e13615. doi: 10.1111/and.13615. PMID: 32324913.
- Li J., Luo L., Diao J., Li Y., Zhang S., Chen L., Yang T., Qin J.: Male sperm quality and risk of recurrent spontaneous abortion in Chinese couples: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2021, 100(10), e24828. doi: 10.1097/MD.00000000000024828. PMID: 33725837.
- Lin A., Yan W.H.: Heterogeneity of HLA-G Expression in Cancers: Facing the Challenges. *Front Immunol.* 2018, 9, 2164. doi: 10.3389/fimmu.2018.02164. PMID: 30319626.
- Liu K.S., Mao X.D., Pan F., An R.F.: Effect and mechanisms of reproductive tract infection on oxidative stress parameters, sperm DNA fragmentation, and semen quality in infertile males. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021, 28, 19(1), 97. doi: 10.1186/s12958-021-00781-6. PMID: 34183027.
- Moffett A., Hiby S.E.: How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta.* 2007, 28 (Suppl A), S51–S56. doi: 10.1016/j.placenta.2006.11.008. PMID: 17292469.
- Magli M.C., Crippa A., Benincasa M., Terzuoli G., Azzena S., Maresca L. *i wsp.*: Sperm chromosome abnormalities in patients with normal karyotype and in translocation carriers: clinical relevance for assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online.* 2020, 41(6), 1055–1069. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.08.005. PMID: 33032906.
- Marquard K., Westphal L.M., Milki A.A., Lathi R.B.: Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years. *Fertil Steril.* 2010, 94(4), 1473–1477. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.06.041.
- Marques P.I., Fernandes S., Carvalho F., Barros A., Sousa M., Marques C.J.: DNA methylation imprinting errors in spermatogenic cells from maturation arrest azoospermic patients. *Andrology.* 2017, 5(3), 451–459. doi: 10.1111/andr.12329. PMID: 28296202.
- McQueen D.B., Zhang J., Robins J.C.: Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2019, 112(1), 54. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.003. PMID: 31056315.
- Meuleman T., Haasnoot G.W., van Lith J.M.M., Verduijn W., Bloemenkamp K.W.M., Claas F.H.J.: Paternal HLA-C is a risk factor in unexplained recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2018, 79(2), e12797. doi: 10.1111/aji.12797. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29205643.
- Mohanty G., Swain N., Goswami C., Kar S., Samanta L.: Histone retention, protein carbonylation, and lipid peroxidation in spermatozoa: Possible role in recurrent pregnancy loss. *Syst Biol Reprod Med.* 2016, 62(3), 201–212. doi: 10.3109/19396368.2016.1148798. PMID: 26980262.
- Molina R.I., Martini A.C., Tissera A., Olmedo J., Senestrari D., De Cuneo M.F. *i wsp.*: Semen quality and aging: Analysis of 9.168 samples in Cordoba, Argentina. *Archivos Espanoles de Urologia.* 2010, 63(3), 214–222.
- Monti M., Lupoli R., Sosa Fernandez L.M., Cirillo F., Di Minno M.: Association of human leukocyte antigen-G 14 bp polymorphism with recurrent pregnancy loss in European countries: a meta-analysis of literature studies. *Fertil Steril.* 2019, 112(3), 577–585.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.05.003. PMID: 31280950.
- Mukhopadhyay D., Varghese A.C., Pal M., Banerjee S.K., Bhattacharyya A.K., Sharma R.K. *i wsp.*: Semen quality and age-specific changes: A study between two decades on 3,729 male partners of couples with normal sperm count and attending an andrology laboratory for infertility-related problems in an Indian city. *Fertil Steril.* 2010, 93(7), 2247–2254. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.135. PMID: 19328484.
- Nederlof I., Meuleman T., van der Hoorn M., Claas F., Eikmans M.: The seed to success: The role of seminal plasma in pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2017, 123, 24–28. doi: 10.1016/j.jri.2017.08.008.
- Nilsson L.L., Funck T., Kjersgaard N.D., Hviid T.V.F.: Next-generation sequencing of HLA-G based on long-range polymerase chain reaction. *HLA.* 2018, 92(3), 144–153. doi: 10.1111/tan.13342. PMID: 30014615.
- Nilsson Lynge L., Djuricic S., Hviid T.V.: Controlling the Immunological Crosstalk during Conception and Pregnancy: HLA-G in Reproduction. *Front Immunol.* 2014, 5, 198. doi: 10.3389/fimmu.2014.00198. PMID: 24860568.
- Nilsson Lynge L., Hornstrup M.B., Perin T.L., Lindhard A., Funck T., Bjerrum P. *i wsp.*: Soluble HLA-G and TGF- β in couples attending assisted reproduction - A possible role of TGF- β isoforms in semen? *J Reprod Immunol.* 2020, 137, 102857. doi: 10.1016/j.jri.2019.102857.
- Nybo Andersen A.M., Olsen J.: The Danish National Birth Cohort: Selected scientific contributions within perinatal epidemiology and future perspectives. *Scand J Public Health.* 2011, 39(7), 115–120. doi: 10.1177/1403494811407674. PMID: 21775368.
- Nybo Andersen A.M., Hansen K.D., Andersen P.K., Davey Smith G.: Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study. *Am J Epidemiol.* 2004, 160(12), 1214–1222. doi: 10.1093/aje/kwh332. PMID: 15583374.
- Nybo Andersen A.M., Urhøj S.K.: Is advanced paternal age a health risk for the offspring? *Fertil Steril.* 2017, 107(2), 312–318. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.12.019. PMID: 28088314.
- O'Flynn O'Brien K.L., Varghese A.C., Agarwal A.: The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril.* 2010, 93(1), 1–12. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.045. PMID: 20103481.
- Oleszczuk K., Giwerzman 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. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26757265.
- Page J.M., Silver R.M.: Genetic Causes of Recurrent Pregnancy Loss. *Clin Obstet Gynecol.* 2016, 59(3), 498–508. doi: 10.1097/GRF.0000000000000217. PMID: 27414972.
- Pal A.K., Ambulkar P.S., Waghmare J.E., Wankhede V., Shende M.R., Tarnekar A.M.: Chromosomal aberrations in couples with pregnancy loss: A retrospective study. *J Hum Reprod Sci.* 2018, 11(3), 247–253. doi: 10.4103/jhrs.JHRS_124_17. PMID: 30568354.
- Pandey D., Gupta S.: Current Update on Recurrent Pregnancy Loss. *J Basic Clin Reprod Sci.* 2019, 8(1), 1–6. doi: 10.4103/2278-960X.194515.

- Pasińska M., Soszyńska K., Runge A., Dąbrowska A., Juraszek A., Janiszewska T.: Badania molekularne w kierunku trombofilii u pacjentek skierowanych do poradni genetycznej z powodu niepowodzeń ciążowych. Doświadczenia jednego ośrodka Molecular diagnostic tests for thrombophilia in patients referred to genetic One center's experience. 3. Ginekol Pol. 2012, 83, 178–182.
- Papúchová H., Meissner T.B., Li Q., Strominger J.L., Tilburgs T.: The Dual Role of HLA-C in Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface. Front Immunol. 2019, 10, 2730. doi: 10.3389/fimmu.2019.02730. PMID: 31921098.
- Pasquier E., Bohec C., Mottier D., Jaffuel S., Mercier B., Férec C. i wsp.: Inherited thrombophilias and unexplained pregnancy loss: An incident case-control study. J Thromb Haemost. 2009, 7(2), 306–311. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03229.x.
- Pereza N., Črnjar K., Buretić-Tomljanović A., Volk M., Kapović M., Peterlin B. i wsp.: Y chromosome azoospermia factor region microdeletions are not associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion in a Slovenian population: Association study and literature review. Fertil Steril. 2013, 99(6), 1663–1667. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.101. PMID: 23410896.
- Persson G., Jørgensen N., Nilsson L.L., Andersen L.H.J., Hviid T.V.: A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy? Hum Immunol. 2020, 81(4), 127–133. doi: 10.1016/j.humimm.2019.09.006. PMID: 31558330.
- Persson G., Melsted W.N., Nilsson L.L., Hviid T.V.: HLA class Ib in pregnancy and pregnancy-related disorders. Immunogenetics. 2017, 69(8–9), 581–595. doi: 10.1007/s00251-017-0988-4. PMID: 28699111.
- Pfeiffer K.A., Fimmers R., Engels G., Van Der Ven H., Van Der Ven K.: The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. Molecular Human Reproduction. 2001, 7(4), 373–378. doi: 10.1093/molehr/7.4.373. PMID: 11279300.
- Pfeifer S., Fritz M., Goldberg J., McClure R.D., Thomas M., Widra E. i wsp.: Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril. 2012, 98 (5), 1103–1111. doi: doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048. PMID: 22835448.
- Piasecka M., Gill K.: Wpływ wieku na płodność. W: Andrologia. Zdrowie mężczyzny od fizjologii do patologii. Red. Prof. dr hab. n. med. Jolanta Słowikowska-Hilczar. Wyd. PZWL. Warszawa 2021, 1159–1177.
- Poorang S., Abdollahi S., Anvar Z., Tabei S.M.B., Jahromi B.N., Moein-Vaziri N. i wsp.: The Impact of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Sperm Methylation and Variants on Semen Parameters and the Chance of Recurrent Pregnancy Loss in the Couple. Clin Lab. 2018, 64(7), 1121–1128. doi: 10.7754/Clin.Lab.2018.171231. PMID: 30146842.
- Puscheck E.E., Jeyendran R.S.: The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. Curr Opin Obstet Gynecol. 2007, 19(3), 222–228. doi: 10.1097/GCO.0b013e32813e3ff0. PMID: 17495637.
- Rabiega-Gmyrek D., Olcijniczak T., Niepsuj-Biniaś J., Guglas-Bochyńska B., Jachowski P., Latos-Bieleńska A. i wsp.: Aberracje chromosomowe jako przyczyna poronień samoistnych. Ginekol Pol. 2015, 86(5), 357–361. doi: 10.17772/gp/2422.
- Ramasamy R., Chiba K., Butler P.L.: Male biological clock: a critical analysis of advanced paternal age. Fertil Steril. 2015a, 103, 1402–1406. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.011. PMID: 25881878.
- Ramasamy R., Scovell J.M., Kovac J.R., Cook P.J., Lamb D.J., Lipshultz L.I.: Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2015b, 103(4), 906–909. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.029. PMID: 25707335.
- Rastogi P., Kumar N., Ahluwalia J., Das R., Varma N., Suri V. i wsp.: Thrombophilic risk factors are laterally associated with Apolipoprotein E gene polymorphisms in deep vein thrombosis patients: An Indian study. Phlebology. 2019, 34(5), 324–335. doi: 10.1177/0268355518802693. PMID: 30282515.
- Regan L., Backos M., Rai R.: The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First-trimester and Second-trimester Miscarriage Green-top Guideline No. 17 Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2011.
- Ritchie C., Ko E.Y.: Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. Andrologia. 2021, 53(1). doi: 10.1111/and.13581.
- Rodrigo L., Meseguer M., Mateu E., Mercader A., Peinado V., Bori L. i wsp.: Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. Biol Reprod. 2019, 101(6), 1091–1101. doi: 10.1093/biolre/iox125. PMID: 31318411.
- Robinson L., Gallos I.D., Conner S.J., Rajkhowa M., Miller D., Lewis S.: The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod. 2012, 27(10), 2908–2917. doi: 10.1093/humrep/des261. PMID: 22791753.
- Rosiak A., Gill K., Jakubik K., Kupś M., Patorski Ł., Kurzawa R. i wsp.: Czy zaawansowany wiek ojcowski ma wpływ na sukces rozrodczy? Część I: Ocena wybranych parametrów seminologicznych. Post Androl Online. 2017a, 4(2), 23–32.
- Rosiak A., Gill K., Jakubik K., Kupś M., Patorski Ł., Kurzawa R. i wsp.: Czy zaawansowany wiek ojcowski ma wpływ na sukces rozrodczy? Część II: Rozwój zarodka, uzyskanie ciąży oraz zdrowie potomstwa. Post Androl Online. 2017b, 4(2), 33–40.
- Rosiak-Gill A., Gill K., Jakubik J., Fraczek M., Patorski Ł., Gaczarzewicz D. i wsp.: Age-related changes in human sperm DNA integrity. Aging (Albany NY). 2019, 11(15), 5399–5411. doi: 10.18632/aging.102120. PMID: 31412318.
- Ross C., Morriss A., Khairy M., Khalaf Y., Braude P., Coomarasamy A. i wsp.: A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. Reprod Biomed Online. 2010, 20(6), 711–723. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.03.008. PMID: 20378409.
- Schallmoser A., Raab M., Karn T., Königsberger S., Schmidt E., Breitenbach-Koller H. i wsp.: Quantitative analysis of the sHLA-G protein in seminal plasma. Am J Reprod Immunol. 2019, 82(3):e13152. doi: 10.1111/aji.13152. PMID: 31132194.
- Sebire N.J.: Recurrent GTD and GTD coexisting with normal twin pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2020 Dec 21:S1521-6934(20)30177-2. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2020.12.002. PMID: 33451920.
- Selvam P.M., Ambar R.F., Agarwal A., Henkel R.: Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. Andrologia. 2021, 53(1), 1–15. doi: 10.1111/and.13706. PMID: 32559347.
- Shamsi M.B., Venkatesh S., Pathak D., Deka D., Dada R.: Sperm DNA damage & oxidative stress in recurrent spontaneous abortion (RSA). Indian J Med Res. 2011, 133(5), 550. PMID: 21623044.
- Sharma R., Agarwal A., Rohra V.K., Assidi M., Abu-Elmagd M., Turki R.F.: Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. Reprod Biol Endocrinol. 2015, 13(1), 1–20. doi: 10.1186/s12958-015-0028-x PMID: 25928123.
- Sheth F.J., Liehr T., Kumari P., Akinde R., Sheth H.J., Sheth J.J.: Chromosomal abnormalities in couples with repeated fetal loss: An Indian retrospective study. Indian J Hum Genet. 2013, 19(4), 415–422. doi: 10.4103/0971-6866.124369. PMID: 24497706.
- Showell M.G., Smits R.M., Mackenzie-Proctor R., Yazdani A., Stankiewicz M.T., Jordan V.: Antioxidants for male subfertility. Cochrane Database Syst Rev. 2014(12). doi: 10.1002/14651858.CD007411.pub4 PMID: 30866036.
- Signore F., Gulia C., Votino R., Leo V. De, Zaami S., Putignani L. i wsp.: The role of number of copies, structure, behavior and copy number variations (CNV) of the Y chromosome in male infertility. Genes. 2020, 11(1). doi: 10.3390/genes11010040. PMID: 31905733.
- Slama R., Bouyer J., Windham G., Fenster L., Werwatz A., Swan S.H.: Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. Am J Epidemiol. 2005, 161(9), 816–823. doi: 10.1093/aje/kwi097. PMID: 15840613.
- Softness K.A., Trussler J.T., Carrasquillo R.J.: Advanced sperm testing. Curr Opin Urol. 2020, 30(3). 290–295. doi: 10.1097/MOU.0000000000000761. PMID: 32235275.
- Stevens S.M., Woller S.C., Bauer K.A., Kasthuri R., Cushman M., Streiff M. i wsp.: Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia J Thromb Thrombolysis 2016, 41, 154–164. doi: 10.1007/s11239-015-1316-1. PMID: 26780744.
- Stone B.A., Alex A., Werlin L.B., Marrs R. P.: Age thresholds for changes in semen parameters in men. Fertil Steril. 2013, 100(4), 952–958. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.046. PMID: 23809502.
- Swales A.K., Spears N.: Genomic imprinting and reproduction. Reproduction. 2005, 130(4), 389–399. doi: 10.1530/rep.1.00395. PMID: 16183857.
- Szczykutowicz J., Kałuża A., Kaźmierowska-Niemczuk M., Ferens-Sieczkowska M.: The Potential Role of Seminal Plasma in the Fertilization Outcomes. Biomed Res Int. 2019, 2019:5397804. doi:10.1155/2019/5397804. PMID: 31531356.

- Talebi A.R., Fesahat F., Mangoli E., Ghasemzadeh H.J., Nayeri M., Sadeghian-Nodoshan F.: Relationship between sperm protamine deficiency and apoptosis in couples with unexplained repeated spontaneous abortions. *Int J Reprod Biomed.* 2016, 14(3), 199–204. doi: 10.29252/ijrm.14.3.199. PMID: 27294219.
- Tan J., Taskin O., Albert A., Bedaiwy M.A.: Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2018, 38(6), 951–960. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.12.029. PMID: 30979611.
- Taylor J.L., Debost J.C.P.G., Morton S.U. i wsp.: Paternal-age-related de novo mutations and risk for five disorders. *Nat Commun.* 2019, 10, 3043 doi: 10.1038/s41467-019-11039-6.
- Toth B., Vocke F., Rogenhofer N., Friese K., Thaler C.J., Lohse P.: Paternal thrombophilic gene mutations are not associated with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2008, 60(4), 325–332. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00630.x. PMID: 18754836.
- Tsuribe P.M., Neto J.F., Golim M. de A., Dell'Aqua C. de P.F., Issa J.P., Gobbo C.A.: Assessment of sperm DNA in patients submitted the assisted reproduction technology procedures. *JBRA Assist Reprod.* 2016, 20(1), 17–22. doi: 10.5935/1518-0557.20160005. PMID: 27203301.
- Udry S., Aranda F.M., Latino J.O., De Larrañaga G.F.: Paternal factor V Leiden and recurrent pregnancy loss: A new concept behind fetal genetics? *J Thromb Haemost.* 2014, 12(5), 666–669. doi: 10.1111/jth.12526. PMID: 24977289.
- van Dijk M.M., Kolte A.M., Limpens J., Kirk E., Quenby S., van Wely M. i wsp.: Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2020, 26(3), 356–367. doi: 10.1093/humupd/dmz048. PMID: 32103270.
- Venkatesh S., Thilagavathi J., Kumar K., Deka D., Talwar P., Dada R.: Cytogenetic, Y chromosome microdeletion, sperm chromatin and oxidative stress analysis in male partners of couples experiencing recurrent spontaneous abortions. *Arch Gynecol Obstet.* 2011, 284(6), 1577–1584. doi: 10.1007/s00404-011-1990-y. PMID: 21779778.
- Voicu D., Munteanu O., Gherghiceanu F., Arsene L., Bohiltea R., Gradinaru D. i wsp.: Maternal inherited thrombophilia and pregnancy outcomes. *Exp Ther Med.* 2020, 20(3), 2411–2414. doi: 10.3892/etm.2020.8747. PMID: 32765725.
- Walczak-Jedrzejowska R.: Stres oksydacyjny a niepłodność męska. Część I: Czynniki wywołujące stres oksydacyjny w nasieniu. *Oxidative Stress and Male Infertility. Part I: Factors Causing Oxidative Stress in Semen.* *Post Androl Online.* 2015, 2(1), 5–15. <http://www.andrologia-pta.com.pl>.
- Walczak-Jedrzejowska R., Wolski J.K., Slowikowska-Hilczner J.: The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol.* 2013, 66(1), 60–67. doi: 10.5173/ceju.2013.01.art19. PMID: 24578993.
- Wang Y., Li Y., Chen Y., Zhou R., Sang Z., Meng L. i wsp.: Systematic analysis of copy-number variations associated with early pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2020, 55(1), 96–104. doi: 10.1002/uog.20412.
- Wang Y., Li G., Zuo M.Z., Fang J.H., Li H.R., Quan D.D. i wsp.: Y chromosome polymorphisms may contribute to an increased risk of male-induced unexplained recurrent miscarriage. *Biosci Rep.* 2017, 37(2), 1–8. doi: 10.1042/BSR20160528. PMID: 28183871.
- Wettasinghe T.K., Jayasekara R.W., Dissanayake V.H.: Y chromosome microdeletions are not associated with spontaneous recurrent pregnancy loss in a Sinhalese population in Sri Lanka. *Hum Reprod.* 2010, 25(12), 3152–3156. doi: 10.1093/humrep/deq271. PMID: 20943704.
- Wiktorowicz K., Kaszkowiak K.: Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. Część 1. Kodowanie i budowa. *Forum Reumatologiczne.* 2018, 4(1), 37–44.
- Witczak B., Klusek J., Klusek J.: Genetic aspects of male infertility. *Studia Medyczne.* 2014, 30(4):276–279. doi: 10.5114/ms.2014.47928.
- Wu Y., Kang X., Zheng H., Liu H., Liu J.: Effect of paternal age on reproductive outcomes of in vitro fertilization. *PLoS ONE.* 2015, 10(9), 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0135734.
- Würfel F.M., Winterhalter C., Trenkwalder P., Wirtz R.M., Würfel W.: European Patent in Immunoncology: From Immunological Principles of Implantation to Cancer Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(8), 1830. doi: 10.3390/ijms20081830. PMID: 31013867.
- Yang X., Yang Y., Yuan Y., Liu L., Meng T.: The Roles of Uterine Natural Killer (NK) Cells and KIR/HLA-C Combination in the Development of Preeclampsia: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2020, 2020, 4808072. doi: 10.1155/2020/4808072. PMID: 32309433.
- Yatsenko A.N., Turek P.J.: Reproductive genetics and the aging male. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Jun;35(6):933–941. doi: 10.1007/s10815-018-1148-y. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29524155; PMCID: PMC6030011.
- Yazdani N., Shekari Khaniani M., Bastami M., Ghasemnejad T., Afkhami F., Mansoori Derakhshan S.: HLA-G regulatory variants and haplotypes with susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Int J Immunogenet.* 2018, 45(4), 181–189. doi: 10.1111/iji.12364. PMID: 29797531.
- Yifu P., Lei Y., Shaoming L., Yujin G., Xingwang Z.: Sperm DNA fragmentation index with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2020, 101740. doi: 10.1016/j.jogoh.2020.101740. PMID: 32348878.
- Youssef A., Lashley L., Dieben S., Verburg H., van der Hoorn M.L.: Defining recurrent pregnancy loss: associated factors and prognosis in couples with two versus three or more pregnancy losses. *Reprod Biomed Online.* 2020, 41(4), 679–685. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.05.016. PMID: 32811769.
- Zhang X., Wang H., Feng T., Yang J., Huang Q., Lu C. i wsp.: The relationship between semen factors and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Clinica Chimica Acta.* 2020, 510(June), 605–612. doi: 10.1016/j.cca.2020.08.022.
- Zhang L., Wang L., Zhang X., Xu G., Zhang W., Wang K. i wsp.: Sperm chromatin integrity may predict future fertility for unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Int J Androl.* 2012, 35(5), 752–757. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01276.x>. PMID: 22519675.
- Zhao J., Zhang Q., Wang Y., Li Y.: Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2014, 102(4), 998–1005.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.06.033. PMID: 25190048.
- Zhu X.B., Chen Q., Fan W.M., Niu Z.H., Xu B.F., Zhang A.J.: Sperm DNA fragmentation in Chinese couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Asian J Androl.* 2020, 22(3), 296–301. doi: 10.4103/aja.aja_60_19. PMID: 31339112.
- Zidi-Jrah I., Hajlaoui A., Mougou-Zerelli S., Kammoun M., Meniaoui I., Sallem A. i wsp.: Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss Presented at the 17th World Congress on in Vitro Fertilization, Tunis, Tunisia, on September 4-7, 2013. *Fertil Steril.* 2016, 105(1), 58–64. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.041. PMID: 26493117