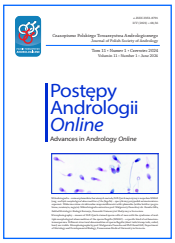
Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego
Journal of Polish Society of Andrology
Postępy Andrologii *Online*
Advances in Andrology *Online*
http://www.postepyandrologii.pl



ZNACZENIE KLINICZNE POTENCJAŁU OKSYDACYJNO-REDUKCYJNEGO (ORP) W LUDZKI NASIENIU WERYFIKOWANEGO ZA POMOCĄ ELEKTROCHEMICZNEGO SYSTEMU MIOXSYS®

THE CLINICAL APPLICATION OF OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL (ORP) IN HUMAN SEMEN USING THE MALE INFERTILE OXIDATIVE SYSTEM – MIOXSYS®

Renata Walczak-Jędrzejowska

Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Department of Reproductive Endocrinology, Chair of Andrology and Reproductive Endocrinology, Medical University of Lodz

Autor do korespondencji / Corresponding author: Renata Walczak-Jędrzejowska, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

tel.: +48 42 272 53 91

e-mail: renata.walczak-jedrzejowska@umed.lodz.pl

Otrzymano / Received: 01.09.2024 r. Zaakceptowano / Accepted: 28.10.2024 r.

DOI: 10.26404/PAO_2353-8791.2024.03

open access

Renata Walczak-Jędrzejowska – dr hab. n. med., absolwentka Uniwersytetu Łódzkiego oraz Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, biolog, specjalność biologia molekularna, diagnosta laboratoryjny. Nauczyciel akademicki w Zakładzie Endokrynologii Płodności Katedry Andrologii i Endokrynologii Płodności Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Współwykonawca polskich i europejskich projektów badawczych. Autor i współautor licznych publikacji naukowych. Członek Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Andrologicznego, członek Międzynarodowego Towarzystwa Andrologicznego. Praca zawodowa i naukowa autorki związana jest z badaniami nad czynnością męskiego układu płciowego i jego zaburzeniami, diagnostyką andrologiczną oraz wpływem czynników środowiskowych na męską płodność.

Renata Walczak-Jędrzejowska – PhD, DSc, a graduate of the University of Lodz and the Medical University of Lublin, is a biologist specializing in molecular biology and a certified laboratory diagnostician. An academic teacher at the Division of Reproductive Endocrinology, Department of Andrology and Reproductive Endocrinology, Medical University of Lodz. Engaged in both Polish and European research projects. The first author and co-author of numerous scientific publications. Member of the International Society of Andrology (ISA) and a Board Member of the Polish Society of Andrology. Research interests focus on the function and disorders of the male reproductive system, andrological diagnostics, and the impact of environmental factors on male fertility.

Access to articles is based on the License Creative Commons BY NC ND 3.0 Polska:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.pl

Streszczenie

Niepłodność męska dotyka około 7% mężczyzn na całym świecie i stanowi izolowany czynnik niepłodności w 20–30% przypadków. Stres oksydacyjny, będący wynikiem zaburzenia równowagi między reaktywnymi formami tlenu a mechanizmami antyoksydacyjnymi, odgrywa kluczową rolę w patogenezie niepłodności męskiej. Powoduje on uszkodzenia lipidów błony komórkowej, białek oraz DNA plemników, co prowadzi do pogorszenia parametrów nasienia i czynności plemników tym samym zmniejszając szanse na zapłodnienie, rozwój zarodka oraz uzyskanie ciąży i jej prawidłowy przebieg. W związku z rosnącą liczbą badań ukazujących istotną rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie zaburzeń męskiej płodności, jednym z postulatów przedstawianym od lat jest rozszerzeniem diagnostyki mężczyzny z niepłodnej pary o testy wykrywające jego obecność w nasieniu/plemnikach, co mogłoby przyczynić się do stosowania bardziej spersonalizowanej i skuteczniejszej terapii.

System MiOXSYS®, przeznaczony do oceny potencjału oksydacyjno–redukcyjnego w nasieniu, został wprowadzony na rynek europejski w 2016 r. W przeciwieństwie do innych metod wykorzystywanych w ocenie stresu oksydacyjnego, ograniczonych tylko do oceny ilości określonych składników układu redoks, umożliwia on pomiar w czasie rzeczywistym równowagi między wszystkimi znanymi i nieznanymi utleniaczami i antyoksydantami znajdującymi się w nasieniu. Ostatecznym wynikiem pomiaru jest wskaźnik ORP (znormalizowana względem koncentracji plemników wartość zmierzonego potencjału oksydacyjno–redukcyjnego). Badania kliniczne wskazują na potencjał systemu MiOXSYS® jako narzędzia diagnostycznego do oceny niepłodności męskiej związanej ze stresem oksydacyjnym. Jednak pomimo swojej innowacyjności i wykazanej wartości klinicznej w licznych badaniach, system MiOXSYS® budzi kontrowersje ze względu na kwestie metodologiczne oraz interpretację wyników.

Słowa kluczowe: męska niepłodność, nasienie, reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, potencjał oksydacyjno–redukcyjny

Abstract

Male infertility affects approximately 7% of men worldwide and is an isolated factor in 20–30% of infertility cases. A key role in the pathogenesis of male infertility is played by oxidative stress (OS), resulting from an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant mechanisms. It damages cell membrane lipids, proteins and DNA of sperm, deteriorating semen parameters and sperm function, thereby reducing the chances of fertilization, embryo development, and pregnancy maintenance. Given the increasing number of studies highlighting the significant role of oxidative stress in the pathogenesis of male infertility, one long-standing proposal has been to expand the diagnostic approach for men from infertile couples by including tests that detect the presence of OS in semen or sperm. This could contribute to the development of more personalized and effective therapies.

The MiOXSYS® system, designed to assess the oxidation-reduction potential (ORP) of semen, was introduced to the European market in 2016. Rather than measuring the concentration of specific components of the redox system, it enables a real-time measurement of the balance between all known and unknown oxidants and antioxidants present in semen. The final result is presented as the ORP index (the value of ORP normalized to sperm concentration).

Clinical studies indicate the potential of the MiOXSYS® system as a diagnostic tool for assessing male infertility associated with oxidative stress. However, despite its innovation and demonstrated clinical value in numerous studies, the MiOXSYS® system has sparked controversy due to methodological issues and the interpretation of results.

Key words: male infertility, semen, reactive oxygen species, oxidation-reduction potential

Skróty / Abbreviations

ABTS – 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) (ang. 2,2'-*Azino-bis*(3-*ethylbenzothiazoline*-6-*sulfonic acid*); ART – rozrod wspomagany medycznie (ang. *assisted reproductive technology*); ATPA – podjednostka alfa syntazy ATP (ang. *ATP synthase subunit alpha*); CE – zgodność europejska (ang. *European Conformity*); CMA3 chromomycyna A3 (ang. *chromomycin A*3); COMET test kometkowy (ang. *comet assay)* ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika do komórki jajowej (ang. *intracytoplasmic sperm injection*); IVF – zapłodnienie pozaustrojowe (ang. *in vitro fertilization*); MiOXSYS® – system do oceny potencjału oksydacyjno–redukcyjnego w nasieniu (ang. *male infertility oxidative system*); MMP – potencjał błony mitochondrialnej (ang. *mitochondrial membrane potential*); MOSI – męska niepłodność spowodowana stresem oksydacyjnym (ang. *Male Oxidative Stress Infertility*); MTCO1 – oksydaza cytochromu c podjednostka I (ang. *mitochondrially encoded cytochrome C oxidase I*); NLR – negatywny współczynnik wiarygodności (ang. *negative likelihood ratio*); ORP – potencjał utleniająco–redukcyjny, redoks, pary redoks (ang. *oxidation–reduction potential*); OS – stres oksydacyjny (ang. *oxidative stress*); OXPHOS – szlak fosforylacji oksydacyjnej w łańcuchu oddechowym (ang. *oxidative phosphorylation at the level of respiratory chain*); PLR – pozytywny współczynnik wiarygodności (ang. *positive likelihood ratio*); PPV – dodatnia wartość predykcyjna (ang. *positive predictive value);* RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS); RLU – względne jednostki światła (ang. *relative light unit*); RS – stres redukcyjny (ang. *reducive stress*); SCSA – ocena struktury chromatyny plemnika (ang. *Sperm Chromatin Structure Assay*); SDF – fragmentacją DNA plemników (ang. *sperm DNA fragmentation*); TEAC – ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej plazmy nasienia metodą kolorymetryczną (ang. *trolox eqiuvalent antioxidant capacity*); TUNEL - znakowanie końców nacięć nici DNA przy użyciu terminalnej transferazy deoksynukleotydowe (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) UQCRC2 – podjednostka 2 kompleksu cytochromu b-c1 (ang. *cytochrome b-c*1 *complex subunit* 2); WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

Wstęp / Introduction

Niepłodność, czyli brak uzyskania ciąży po 12 miesiącach regularnego współżycia pary (3–4-krotnie w tygodniu) bez stosowania środków antykoncepcyjnych, dotyka około 20% par na całym świecie. Została ona zakwalifikowana przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) jako choroba cywilizacyjna i szacuje się, że stanowi problem społeczny, który w najbliższych latach będzie przybierał na sile (*Agarwal i wsp.*, 2015; 2019b). Czynnik męski odpowiada za około 50% wszystkich przypadków zaburzeń płodności pary, przy czym w około 20–30% stanowi czynnik izolowany. Szacuje się, że w skali globalnej około 7% mężczyzn boryka się z problemem niepłodności (*Agarwal i wsp.*, 2015; *Alfaro-Gomez i wsp.*, 2023; *Dimitriadis i wsp.*, 2021; *Evans i wsp.*, 2021).

Zaburzenia męskiej płodności mają charakter wieloczynnikowy. Mogą one być wynikiem zaburzeń endokrynologicznych, genetycznych, anatomicznych, chorób systemowych czy infekcji w męskim układzie płciowym, a także niekorzystnego wpływu zanieczyszczenia środowiska czy czynników związanych ze stylem życia. W wielu przypadkach u podłoża tych zaburzeń występuje stres oksydacyjny (OS, ang. *oxidative stress*) (ok. 30–40%). Jednakże, pomimo ciągłego rozwoju wiedzy na temat przyczyn zaburzeń męskiej płodności oraz metod diagnostycznych, aż u ok. 30–50% mężczyzn stwierdza się niepłodność idiopatyczną, charakteryzującą się nieprawidłowymi wynikami podstawowego badania nasienia, bez identyfikowalnej przyczyny, przy braku żeńskiego czynnika niepłodności. Obecnie, na podstawie dostępnych badań, szacuje się, że aż w około 80% przypadków męskiej niepłodności idiopatycznej główną przyczyną obserwowanych nieprawidłowości w nasieniu może być OS (*Agarwal i wsp.*, 2019b; *Baskaran i wsp.*, 2021; *Evans i wsp.*, 2021; *Majzoub i wsp.*, 2018; *Wagner i wsp.*, 2017). Jego występowanie w nasieniu (plemnikach) przyczynia się do: 1) zmniejszenia szansy na uzyskanie zapłodnienia w warunkach naturalnej koncepcji, jak i przy wykorzystaniu technik wspomaganego rozrodu, 2) nieprawidłowego rozwój zarodka czy 3) wzrostu ryzyka wystąpienia nawracających poronień (*Agarwal i wsp.*, 2014; 2019b).

Infertility, defined as the inability to achieve pregnancy after 12 months of regular unprotected intercourse three to four times per week, affects approximately 20% of couples worldwide. It has been classified by the World Health Organization (WHO) as a civilization-related disease and is estimated to represent a social issue that is expected to intensify in the coming years (*Agarwal et al.*, 2015; 2019b). The male factor accounts for approximately 50% of all cases of infertility in couples, with 20–30% representing an isolated factor. It is estimated that globally, around 7% of men struggle with infertility (*Agarwal et al.*, 2015; *Alfaro-Gomez et al.*, 2023; *Dimitriadis et al.*, 2021; *Evans et al.*, 2021).

Male infertility is a multifactorial condition that can result from endocrine, genetic, or anatomical disorders, systemic diseases, infections in the male reproductive system, or the adverse effects of environmental pollution or lifestyle-related factors. In many cases, the underlying factor is oxidative stress (OS), contributing to approximately 30–40% of cases; however, despite ongoing advances in understanding the causes of male infertility and improvements in diagnostic methods, 30–50% of infertile men are diagnosed with idiopathic infertility. This condition is characterized by abnormal semen parameters without an identifiable cause and in the absence of a female infertility factor. Current evidence suggests that in up to 80% of idiopathic male infertility cases, the primary cause of the abnormalities observed in semen may be OS (*Agarwal et al.*, 2019b; *Baskaran et al.*, 2021; *Evans et al.*, 2021; *Majzoub et al.*, 2018; *Wagner et al.*, 2017), whose presence in semen (sperm) contributes to: 1) reduced chances of achieving fertilization through natural conception or assisted reproductive technologies, 2) impaired embryo development, and 3) an increased risk of recurrent pregnancy loss (*Agarwal et al.*, 2014; 2019b).

Stres oksydacyjny w nasieniu / Oxidative stress in semen

Stres oksydacyjny jest wynikiem zachwiania równowagi między wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*), do których należą głównie wolne rodniki (*Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Otasevic i wsp.*, 2020), a działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego w sytuacjach, gdy komórki, czy też tkanki narażone są na dodatkowe, egzogenne źródła RFT, lub gdy zwiększa się tempo ich endogennej produkcji, bądź też zmniejsza się wydolność ochronnych systemów antyoksydacyjnych

Oxidative stress occurs as a result of an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS), which mainly include free radicals (*Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Otasevic et al.*, 2020), and the activity of the protective antioxidant system. This imbalance can arise when cells or tissues are exposed to additional exogenous sources of radicals, when the rate of their endogenous production increases, or when the efficiency of the antioxidant

(*Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Marchlewicz i wsp.*, 2016; *Kowalczyk*, 2022).

Terminem RFT określa się związki tlenu wykazujące większą reaktywność niż tlen cząsteczkowy w stanie podstawowym (trypletowym). Należą do nich wolne rodniki zawierających co najmniej jeden niesparowany elektron walencyjny (np. anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, wodorotlenkowy czy alkoksylowy) oraz związki niebędące wolnymi rodnikami, powstające w wyniku metabolizmu tlenu (np. tlen singletowy, nadtlenek wodoru, ozon czy kwas podchlarawy). Jako cząsteczki bardzo reaktywne szybko wchodzą one w reakcje z makromolekułami komórkowymi (białka, lipidy, kwasy nukleinowe) i indukują powstanie kolejnych produktów wolnorodnikowych. Następstwem OS, jest utlenienie białek, peroksyadcja lipidów oraz uszkodzenia DNA, w tym DNA mitochondrialnego, a także zmiany w epigenomie plemników. Skutkuje to zaburzeniem jakości/czynności męskich gamet wpływając na ich potencjał do zapłodnienia komórki jajowej oraz powstanie zdrowego zarodka. Ponadto stres oksydacyjny może wywołać generowanie genotoksycznych i mutagennych produktów ubocznych w plemnikach, które mogą zwiększać ryzyko chorób u potomstwa (*Aitken*, 2017; *Takeshima i wsp.*, 2020; *Ritchie* i *Ko*, 2020; *Ribas-Maynou* i *Yeste*, 2020).

Ilość RFT jest ściśle kontrolowana przez mechanizmy antyoksydacyjne. Zarówno komórki, jak i płyny ustrojowe – w tym plazma nasienia i plemniki – zawierają związki o właściwościach antyoksydacyjnych, które regulują ilość RFT poprzez neutralizację i usuwanie ich nadmiaru. Proces ten odbywa się w ramach systemu zwanego „układem redoks" i umożliwia utrzymanie równowagi oksydacyjno–redukcyjnej. Należą do nich enzymy (dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza, peroksydaza glutationowa/reduktaza glutationowa) i nieenzymatyczne, niskocząsteczkowe związki o charakterze przeciwutleniaczy (np. witamina A, C, E, glutation, cysteina, homocyteina, transferryna, cynk, selen, miedź, tauryna, hipotauryna). Związki te ściśle współdziałają ze sobą w celu zapewnienia optymalnej ochrony przed nadmiarem RFT i wydaje się, że niedobór jednego z nich może powodować obniżenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego organizmu/układu biologicznego (*Frączek* i *Kurpisz*, 2005; *Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Marchlewicz i wsp.*, 2016; *Kowalczyk*, 2022; *Ribeiro i wsp.*, 2021).

Niemniej jednak należy podkreślić, że niskie, kontrolowane (fizjologiczne) poziomy RFT odgrywają istotną rolę w prawidłowej produkcji i czynności plemnika. W jądrze zaangażowane są w proces namnażania, różnicowania czy apoptozy komórek plemnikotwórczych, a w najądrzu biorą udział w procesie dojrzewania plemników. W żeńskich drogach rodnych, podczas procesu zapłodnienia regulują proces kapacytacji, hiperaktywacji, reakcji akrosomalnej i ostatecznie fuzji z oocytem (*Aitken* i *Drevet*, 2020; *Baskaran i wsp.*, 2021; *Juarez-Rojas i wsp.*, 2022; *Mancini i wsp.*, 2023).

defense systems decreases (*Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Marchlewicz et al.*, 2016; *Kowalczyk*, 2022).

Reactive oxygen species are oxygen-containing compounds that exhibit greater reactivity than molecular oxygen in its ground (triplet) state. These include free radicals containing at least one unpaired valence electron (e.g., superoxide anion radical, hydroxyl radical, peroxyl radical, or alkoxyl radical) as well as non-radical oxygen derivatives produced during oxygen metabolism (e.g., singlet oxygen, hydrogen peroxide, ozone, or hypochlorous acid). Due to their high reactivity, these molecules readily react with cellular macromolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids, leading to the formation of additional free radical products. The consequences of OS hence include protein oxidation, lipid peroxidation, damage to nuclear and mitochondrial DNA, as well as alterations in the sperm epigenome. This impairs the quality and function of male gametes, adversely affecting their ability to fertilize the oocyte and support healthy embryo development. Furthermore, OS can lead to the generation of genotoxic and mutagenic by-products in sperm, which may increase the risk of diseases in offspring (*Aitken*, 2017; *Takeshima et al.*, 2020; *Ritchie* and *Ko*, 2020; *Ribas-Maynou* and *Yeste*, 2020).

The quantity of ROS is tightly regulated by antioxidant mechanisms. Both cells and body fluids, including seminal plasma and sperm cells, contain antioxidant compounds that control ROS levels by neutralizing and eliminating excess radicals. This process operates within a system referred to as the redox system, which maintains redox balance. The system itself includes both enzymes (superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase/reductase) and non-enzymatic compounds, i.e., low-molecular-weight antioxidants such as vitamins A, C, and E, glutathione, cysteine, homocysteine, transferrin, zinc, selenium, copper, taurine and hypotaurine. These compounds interact closely to provide optimal protection against excess ROS, and a deficiency in any one of them may reduce the overall antioxidant potential of the organism or biological system (*Frączek* and *Kurpisz*, 2005; *Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Marchlewicz et al.*, 2016; *Kowalczyk*, 2022; *Ribeiro et al.*, 2021).

Nevertheless, it should be emphasized that low, controlled (physiological) levels of ROS play a crucial role in the proper production and function of sperm. In the testes, ROS are involved in the proliferation, differentiation, and apoptosis of spermatogenic cells, while in the epididymis, they contribute to sperm maturation. In the female reproductive tract, during fertilization, ROS regulate key processes such as capacitation, hyperactivation, the acrosome reaction, and ultimately, fusion with the oocyte (*Aitken* and *Drevet*, 2020; *Baskaran et al.*, 2021; *Juarez-Rojas et al.*, 2022; *Mancini et al.*, 2023).

Za główne endogenne, komórkowe źródła RFT w nasieniu uważa się leukocyty (neutrofile, makrofagi) oraz plemniki o nieprawidłowej budowie, z nadmiarem resztkowej cytoplazmy, które generują RFT w wyniku aktywności znajdującej się w niej oksydazy NADPH a także takie, w których doszło do dysfunkcji mitochondriów prowadzącej do zwiększonego wycieku elektronów z łańcucha oddechowego (*Frączek* i *Kurpisz*, 2005; *Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Panday i wsp.*, 2015; *Agarwal i wsp.*, 2018; *Aitken i wsp.*, 2022; *Baskaran i wsp.*, 2021; *Azzi*, 2022; *Takeshima i wsp.*, 2020). Inne endogenne źródła RFT, związane z zaburzeniami układu płciowego to między innymi żylaki powrózka nasiennego, nowotwory, skręt jądra, wnętrostwo czy infekcje układu moczowo–płciowego. Z kolei do egzogennych czynników generujących OS należą czynniki środowiskowe (zanieczyszczenie środowiska, metale ciężkie), czynniki związane ze stylem życia (palenie, alkohol, nieprawidłowa dieta), także wiek mężczyzny oraz niektóre leki, radio- czy chemioterapia (*Barati i wsp.*, 2020; *Fraczek i wsp.*, 2020; *Gill i wsp.*, 2021; *Ritchie* i *Ko*, 2021; *Tanaka i wsp.*, 2022; *Agarwal i wsp.*, 2018; *Evans i wsp.*, 2021; *Kumar* i *Singh*, 2018; *He i wsp.*, 2020; *Nago i wsp.*, 2021; *Zhao i wsp.*, 2016; *Zargari i wsp.*, 2022; *Aitken*, 2023; *Wdowiak i wsp.*, 2024).

Tak więc, w związku z rosnącą liczbą badań ukazujących istotną rolę OS w patogenezie zaburzeń męskiej płodności, zasadnym wydaje się dyskusja nad rozszerzeniem diagnostyki mężczyzny z niepłodnej pary o testy wykrywające jego obecność w nasieniu/plemnikach, co mogłoby przyczynić się do stosowania bardziej spersonalizowanej i skuteczniejszej terapii. O istotności tego problemu świadczy wprowadzenie w 2019 r. terminu „męska niepłodność spowodowana stresem oksydacyjnym" (MOSI, ang. *Male Oxidative Stress Infertility*), pozwalającego na wyodrębnienie grupy niepłodnych mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia i współistniejącym OS, którzy wcześniej, w dużej mierze, klasyfikowani byli jako mężczyźni z niepłodnością idiopatyczną (*Agarwal i wsp.*, 2019b). Lepsze zrozumienie etiologii OS w zaburzeniach męskiej płodności, może pomóc w identyfikacji mężczyzn, którzy prawdopodobnie odniosą korzyści z terapii antyoksydacyjnej, jednocześnie minimalizując szkodliwe skutki przedawkowania antyoksydantów, które prowadzą do tzw. stresu redukcyjnego (RS, ang. *reductive stress*) (*Henkel i wsp.*, 2019). W ostatnich latach, coraz częściej podnosi się kwestię tzw. „paradoksu antyoksydacyjnego", czyli nadmiernego stosowania suplementów antyoksydacyjnych i związanego z tym ryzyka wystąpienia w nasieniu/plemnikach RS, którego skutki dla płodności są tak samo niekorzystne, jak te związane z OS. Stres redukcyjny może z jednej strony indukować wtórny stres oksydacyjny, a z drugiej – nadmiernie obniżać poziom fizjologicznych RFT, które są niezbędne dla prawidłowej funkcji plemników (*Dutta i wsp.*, 2021; 2022). W jego efekcie, podobnie jak przy OS, dochodzi do uszkodzeń DNA plemników, obniżenia ich ruchliwości a także zakłócenia kluczowych procesów

The primary endogenous cellular sources of ROS in semen are leukocytes (neutrophils and macrophages) and structurally abnormal spermatozoa with excessive residual cytoplasm, generating ROS due to the activity of NADPH oxidase present in it, as well as sperm with mitochondrial dysfunction, leading to increased electron leakage from the respiratory chain (*Frączek* and *Kurpisz*, 2005; *Walczak-Jędrzejowska*, 2015; *Panday et al.*, 2015; *Agarwal et al.*, 2018; *Aitken et al.*, 2022; *Baskaran et al.*, 2021; *Azzi*, 2022; *Takeshima et al.*, 2020). Other endogenous ROS sources associated with reproductive system disorders include varicocele, testicular cancer, testicular torsion, cryptorchidism, and infections of the genitourinary system. Exogenous factors contributing to OS include environmental pollutants (e.g., heavy metals), lifestyle factors (e.g., smoking, alcohol consumption, and poor diet), male age, as well as certain medications, radiotherapy, or chemotherapy (*Barati et al.*, 2020; *Fraczek et al.*, 2020; *Gill et al.*, 2021; *Ritchie* and *Ko*, 2021; *Tanaka et al.*, 2022; *Agarwal et al.*, 2018; *Evans et al.*, 2021; *Kumar* and *Singh*, 2018; *He et al.*, 2020; *Nago et al.*, 2021; *Zhao et al.*, 2016; *Zargari et al.*, 2022; *Aitken*, 2023; *Wdowiak et al.*, 2024).

Given the growing body of research highlighting the significant role of OS in the pathogenesis of male infertility, there may be a part for OS detection tests in the diagnostic workup of men from infertile couples. Indeed, their inclusion could contribute to the design of more personalized and effective treatment strategies. The importance of this issue is underscored by the introduction of the term "*Male Oxidative Stress Infertility*" (MOSI) in 2019, which defines a subset of infertile men with abnormal semen parameters and coexisting OS. Previously, many of these individuals were classified under the broad category of idiopathic infertility (Agarwal et al., 2019b). A better understanding of the etiology of OS in male infertility could aid in identifying men likely to benefit from antioxidant therapy. Such an understanding could also minimize *reductive stress* (RS), i.e. the harmful effects of antioxidant overdose (*Henkel et al.*, 2019). Recent years have seen greater attention afforded to the concept of the *antioxidant paradox*, i.e. the excessive use of antioxidant supplements and the associated risk of inducing RS in semen. The effects of RS on fertility are as detrimental as those of OS, as it can induce secondary OS or excessively lower the physiological levels of ROS, which are essential for normal sperm function (*Dutta et al.*, 2021; 2022). Similar to OS, RS can result in sperm DNA damage, reduced motility and the disruption of key fertilization processes, such as capacitation, the acrosome reaction, and oocyte penetration (*Henkel et al.*, 2019, *Sadeghi et al.*, 2023; *Moustakli et al.*, 2024). Unfortunately, as studies indicate, the easy availability of antioxidant

zapłodnienia tj. kapacytacja, reakcja akrosomalna czy penetracja komórki jajowej (*Henkel i wsp.*, 2019, *Sadeghi i wsp.*, 2023; *Moustakli i wsp.*, 2024). Niestety, jak wskazują badania, łatwa dostępność suplementów antyoksydacyjnych, bez konieczności posiadania recepty, a także ogólne przekonanie o ich pozytywnym wpływie na płodność w kontekście przeciwdziałania skutkom wszechobecnego OS, stanowi realne ryzyko dla wywołania RS w nasieniu (*Martin-Hidalgo i wsp.*, 2019; *Alfaro-Gomez i wsp.*, 2023; *Symeonidos i wsp.*, 2021). Tak więc, nie ulega wątpliwości, że oprócz edukacji pacjentów na temat ryzyka związanego z nadmiernym stosowaniem antyoksydantów, niezbędne jest wprowadzenie dodatkowych narzędzi diagnostycznych, które powalą na dokładną ocenę równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w nasieniu i tym samym optymalizację leczenia.

supplements without a prescription, coupled with a widespread belief in their positive effects on fertility as a countermeasure to the pervasive effects of OS, poses a real risk of inducing RS in semen (*Martin-Hidalgo et al.*, 2019; *Alfaro-Gomez et al.*, 2023; *Symeonidos et al.*, 2021). Therefore, there is no doubt that in addition to educating patients about the risks associated with excessive antioxidant use, it is crucial to implement additional diagnostic tools that allow for precise assessment of the oxidative-reductive balance in semen, thereby optimizing treatment strategies.

Ocena stresu oksydacyjnego w nasieniu z wykorzystaniem systemu MiOXSYS® Assessment of Oxidative Stress in Semen Using the MiOXSYS® System

Istnieje wiele metod, zarówno bezpośrednich, jak i pośrednich, stosowanych do badania OS w różnych systemach biologicznych. Jednakże, analiza OS powinna uwzględniać nie tylko ilościową ocenę reaktywnych form tlenu, ale także zdolność antyoksydacyjną płynów biologicznych. Dlatego też w obecnej edycji podręcznika WHO z 2021 r. dotyczącego badania nasienia, oprócz oceny poziomu reaktywnych form tlenu w nasieniu i/lub plemnikach z wykorzystaniem chemiluminescencji, dodane zostały testy umożliwiające ocenę całkowitej zdolności antyoksydacyjnej plazmy nasienia (metoda kolorymetryczna, TEAC, ang. *trolox eqiuvalent antioxidant capacity*) a także potencjału oksydacyjno–redukcyjnej nasienia (z wykorzystaniem systemu MiOXSYS®, ang. *male infertility oxidative system*) (*WHO*, 2021).

Bezpośredni pomiaru RFT z wykorzystaniem metody chemiluminescencyjnej, opiera się na reakcji rodników tlenowych z odpowiednim znacznikiem (np. luminolem). Wyniki wyrażane są jako ilość względnych jednostek światła (RLU, ang. *relative light unit*) w czasie, w przeliczeniu na 10^6 plemników (RLU/s/10^6 plemników) (*Agarwal i wsp.*, 2017b).

Metoda oceny całkowitej zdolności antyoksydacyjnej plazmy nasienia, polega na oznaczaniu zdolności przeciwutleniaczy do neutralizacji niebieskiego kationorodnika generowanego z 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) (ABTS, ang. 2,2'-*Azino-bis*(3-*ethylbenzothiazoline*-6-*sulfonic acid*) pod wpływem nadsiarczanu sodu, co powoduje spadek absorbancji. Zdolność antyoksydacyjna próbki jest porównywana ze zdolnością antyoksydacyjną standardu – troloksu (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksylowy) i wyrażana jest w µM ekwiwalentu troloksu (*Miller i wsp.*, 1993).

Z kolei pomiar potencjału oksydacyjno–redukcyjnego (inaczej potencjał utleniająco–redukcyjny, redoks czy też pary redoks; ORP, ang. *oxidation–reduction potential*) jest miarą przemieszczania się elektronów z jednej

Numerous direct and indirect methods are used to evaluate OS in various biological systems. However, such assessments should encompass not only the quantitative measurement of ROS, but also the total antioxidant capacity of biological fluids. A comprehensive analysis of OS should integrate both aspects for a more accurate evaluation. In line with this approach, the latest edition of the WHO manual for semen analysis (*WHO*, 2021) has incorporated additional tests to assess OS in semen. In addition to measuring ROS levels in semen and/or sperm using chemiluminescence, the manual now includes tests for total antioxidant capacity (TAC) of seminal plasma, assessed using the colorimetric method and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Furthermore, the oxidative–reductive potential (ORP) of semen is evaluated using the MiOXSYS® system (*male infertility oxidative system*). These additions aim to enhance the comprehensiveness of OS assessment in male infertility diagnostics.

The chemiluminescence method allows direct measurement of ROS based on the reaction of oxygen radicals with a suitable probe (e.g., luminol). The results are expressed as the relative light unit (RLU) per second, normalized to 10^6 spermatozoa (RLU/s/10^6 sperm) (*Agarwal et al.*, 2017b).

The total antioxidant capacity (TAC) of seminal plasma is determined based on the ability of antioxidants to neutralize the blue cation radical generated from 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in the presence of sodium persulfate. The resulting decrease in absorbance is compared to that of a standard antioxidant, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), and is expressed in µM trolox equivalents (*Miller et al.*, 1993).

substancji chemicznej (cząsteczki) na drugą (*Agarwal i wsp.*, 2016). Parametr ORP nie mierzy stężenia, lecz aktywność, koncentrując się na bezpośrednim pomiarze elektronów w ruchu podczas reakcji redoks. Transfer elektronów wytwarza potencjał elektryczny określany przez stosunek aktywności utlenionych i zredukowanych związków, który oblicza się za pomocą równania Nernsta:

$$ORP = E° - RT/nF \times \ln([Ox]/[Red])$$

gdzie:

E° = standardowy potencjał redukcyjny
R = uniwersalna stała gazowa
T = temperatura (Kelvin)
n = liczba moli wymienianych elektronów
F = stała Faradaya
[Red] = stężenie zredukowanych form
[Ox] = stężenie utlenionych form

Tak więc, ORP stanowi liczbowy wskaźnik warunków utlenienia lub redukcji w układzie, tzn. ogólnej aktywności wszystkich utleniaczy i antyoksydantów. W przeciwieństwie do innych metod wykorzystywanych w ocenie OS, ograniczonych tylko do oceny stężenia określonych składników układu redoks (wolnych rodników – metoda chemiluminescencyjna lub antyoksydantów – pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej), ORP umożliwia pomiar w czasie rzeczywistym równowagi między wszystkimi znanymi i nieznanymi utleniaczami i antyoksydantami znajdującym się w danym układzie biologicznym. Pomiar ORP wykorzystywany jest od lat do oceny jakości wody, w badaniach ekotoksykologicznych czy też w celach diagnostycznych do oceny OS w różnych płynach ustrojowych np. surowicy krwi (*Tantra i wsp.*, 2012; *Bjugstad i wsp.*, 2016; *Heldmaier i wsp.*, 2018; *Atchie i wsp.*, 2023).

System MiOXSYS®, przeznaczony do oceny ORP w nasieniu, został wprowadzony na rynek europejski na początku 2016 r. przez firmę Aytu BioScience Inc. (USA). Oprócz pomiaru ORP w nasieniu lub plazmie nasienia (*Agarwal i wsp.*, 2016), urządzenie może być wykorzystywane także do oceny ORP np. w mediach służących do przygotowywania plemników czy hodowli zarodków przy procedurach rozrodu wspomaganego medycznie (ART, ang. *assisted reproductive technology*) (*Panner Selvam i wsp.*, 2018; *Niu i wsp.*, 2023). System MiOXSYS® został dopuszczony do użytku w krajach Unii Europejskiej oraz posiada oznaczenie CE (ang. *European Conformity*; zgodność europejska). Został również zarejestrowany w Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych w Polsce. Oznaczenie CE potwierdza, że MiOXSYS® spełnia podstawowe wymagania dotyczące bezpieczeństwa, ochrony zdrowia i ochrony środowiska, określone w odpowiednich dyrektywach Unii Europejskiej. System jest również zgodny z Rozporządzeniem Unii Europejskiej 2017/745 (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745) w sprawie wyrobów medycznych, co dodatkowo gwarantuje jego zgodność z najwyższymi standardami jakości i bezpieczeństwa.

In contrast, oxidation-reduction potential (ORP), also known as redox potential or redox pair potential, does not measure concentration but rather activity, focusing on the direct measurement of electrons in motion during redox reactions (*Agarwal et al.*, 2016). The transfer of electrons generates an electric potential, which is determined by the ratio of the activity of oxidized to reduced compounds, and is calculated using the Nernst equation:

$$ORP = E° - RT/nF \times \ln([Ox]/[Red])$$

where:

E° = standard electrode potential
R = gas constant
T = temperature (Kelvin)
n = numbers of moles of electrons transferred
F = Faraday constant
[Red] = concentration of reduced species
[Ox] = concentration of oxidized species

Thus, ORP represents a numerical indicator of the oxidative or reductive conditions within a system, reflecting the overall activity of all oxidants and antioxidants. Unlike other methods used to evaluate OS, which are limited to assessing the concentration of specific components of the redox system, i.e. free radicals using the chemiluminescence method or antioxidants via TAC measurement, ORP enables real-time measurement of the balance between all known and unknown oxidants and antioxidants in a given biological system. ORP measurement has been utilized for years to assess water quality, in ecotoxicological studies, and for diagnostic purposes in evaluating OS in various biological fluids, such as blood serum (*Tantra et al.*, 2012; *Bjugstad et al.*, 2016; *Heldmaier et al.*, 2018; *Atchie et al.*, 2023).

The MiOXSYS® system, designed for assessing ORP in semen, was introduced to the European market in early 2016 by Aytu BioScience Inc (USA). In addition to measuring ORP in semen or seminal plasma (*Agarwal et al.*, 2016) the device can also be used for evaluating ORP in media utilized for sperm preparation or embryo culture during assisted reproductive technology (ART) procedures (*Panner Selvam et al.*, 2018; *Niu et al.*, 2023). The MiOXSYS® system is approved for use in the European Union and holds a CE (European Conformity) certification, indicating that it meets essential safety, health, and environmental protection requirements outlined in relevant EU directives. It is also registered with the Office for Registration of Medicinal Products in Poland. Additionally, the system complies with the European Union Medical Device Regulation 2017/745 (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745), ensuring adherence to the highest quality and safety standards.

The principle of ORP measurement is based the use of an electrochemical sensor that detects the

Zasada pomiaru ORP opiera się na wykorzystaniu elektrochemicznego czujnika, który mierzy przepływ elektronów między reduktorami a utleniaczami w próbce. Procedura rozpoczyna się od umieszczenia 30 µL próbki nasienia na specjalnym czujniku (jednorazowy chip) wyposażonym w trzy elektrody: elektrodę odniesienia – utrzymująca stabilny potencjał elektryczny dla kalibracji, elektrodę pomiarową – rejestrującą zmiany potencjału w próbce oraz elektrodę pomocniczą – wspomagającą zamknięcie obwodu elektrochemicznego. Po nałożeniu próbki na czujnik i umieszczenie go w porcie urządzenia pomiarowego, następuje detekcja napięcia powstałego pomiędzy elektrodą referencyjną a roboczą w czasie rzeczywistym. Całość pomiaru trwa mniej niż 5 min, co czyni system MiOXSYS® szybkim i łatwym w użyciu narzędziem diagnostycznym. Wynik pomiaru, czyli tzw. „surowy" ORP (ORP lub sOPR – ang. *static ORP*), to uśredniona wartość pomiaru z 20 odczytów wykonanych w ciągu 10 sekund, wyrażona w miliwoltach (mV). Według zaleceń producenta oraz dostępnych protokołów pomiaru, uzyskany wynik ORP nasienia wymaga normalizacji względem koncentracji plemników (*Agarwal i wsp.*, 2016; 2017a, b, c; *Agarwal* i *Bui*, 2017; *Agarwal* i *Wang*, 2017). Tak więc, uzyskany wynik ORP dzieli się przez wyliczoną koncentracją plemników danej próbki, a ostateczny wynik wyrażony jest w mV/10^6 plemników/mL i niekiedy nazywany jest wskaźnikiem lub indeksem sORP (ang. *sORP index*). Uzasadnieniem stosowanej normalizacji, ma być fakt, że ORP w nasieniu zależy z jednej strony od liczby i stanu fizjologicznego plemników, które są źródłem RFT, a z drugiej strony od zdolności antyoksydacyjnej plazmy nasiennej (*Aitken* i *Fisher*, 1994; *Fisher* i *Aitken*, 1997; *Gomez i wsp.*, 1996; *Agarwal i wsp.*, 2017c). Dlatego też, normalizacja wyniku ORP względem koncentracji plemników ma umożliwić bezpośrednie porównywanie wyników uzyskanych z próbek nasienia od mężczyzn o różnym potencjale płodności (dawcy, mężczyźni z zaburzeniami płodności), o różnym podłożu zaburzeń płodności, czy pochodzących z różnych regionów geograficznych (*Agarwal i wsp.*, 2017c).

Według producenta, ograniczenia dotyczące wykonywania pomiaru związane są z podwyższoną lepkością nasienia oraz niską koncentrację plemników (< 1 mln/mL). Dodatkowe ograniczenie pomiaru stanowi temperatura próbki. W badaniach walidacyjnych metody zaobserwowano, że wynik sORP (mV) w badanym zakresie od 2 do 37°C ulegał wzrostowi wraz ze wzrostem temperatury. Dlatego też sugeruje się wykonywanie pomiarów w wystandaryzowanej temperaturze, najlepiej w 37°C, która jest temperaturą odzwierciedlającą warunki fizjologiczne (*Vassiliou i wsp.*, 2021). Analiza powtarzalności wyników uzyskanych z pomiarów wykonywanych przez różne osoby, na różnych urządzeniach w różne dni wykazała, że występuje wysoka zgodność wewnątrzobserwacyjna (ang. *intra-observer*) i międzyobserwacyjna (ang. *intra-observer*) uzyskiwanych wyników (*Agarwal i wsp.*, 2016; *Vassiliou i wsp.*, 2021). Także szybkie zamrażanie

flow of electrons between reductants and oxidants in the sample. The procedure begins with placing 30 µL of semen sample on a specialized disposable chip equipped with three electrodes: a reference electrode, which maintains a stable electric potential for calibration, a working electrode, which records potential changes in the sample, and an auxiliary electrode, which supports the completion of the electrochemical circuit. After the sample is applied to the sensor and inserted it into the device, the system detects the voltage generated between the reference and working electrodes in real time. The entire measurement process takes less than five minutes, making MiOXSYS® a fast and user-friendly diagnostic tool. The measurement result, known as the *raw* or *static* ORP (sORP), is the mean value of 20 readings taken over 10 seconds and is expressed in millivolts (mV).

According to the manufacturer's recommendations and established measurement protocols, the obtained ORP value requires normalization relative to sperm concentration (*Agarwal et al.*, 2016; 2017a, b, c; *Agarwal* and *Bui*, 2017; *Agarwal* and *Wang*, 2017). Thus, the obtained ORP value is divided by the calculated sperm concentration of the sample, and the final result is expressed in mV/10^6 sperm/mL, sometimes referred to as the sORP index. The rationale for normalization is based on the observation that ORP in semen depends both on the number and physiological state of spermatozoa, as sources of ROS, and the antioxidant capacity of the seminal plasma (*Aitken* and *Fisher*, 1994; *Fisher* and *Aitken*, 1997; *Gomez et al.*, 1996; *Agarwal et al.*, 2017c). Normalizing the ORP value relative to sperm concentration enables direct comparison of results across semen samples from men with varying fertility potential (e.g., donors or men with infertility), different underlying causes of infertility, or originating from diverse geographical regions (*Agarwal et al.*, 2017c).

As noted by the manufacturer, the measurement is limited by increased semen viscosity and low sperm concentration (< 1 million/mL). An additional limitation is the temperature of the sample. Validation studies have found sORP (mV) to increase with temperature within the tested range of 2°C to 37°C. Therefore, it is recommended to perform measurements at a standardized temperature, preferably at 37°C, which reflects physiological conditions. (*Vassiliou et al.*, 2021). Even so, high intra-observer and inter-observer agreement have been reported between measurements conducted by different individuals, on different devices, and on different days (*Agarwal et al.*, 2016; *Vassiliou et al.*, 2021). Additionally, neither rapid freezing and storage of samples at –80°C for 30 days, nor vigorous mechanical mixing of the sample, affected the ORP index results (*Vassiliou et al.*, 2021). However, higher semen pH (≥8.0) was associated with greater variability between successive sORP measurements

i przechowywanie próbki przez 30 dni w temp. –80°C jak i mechaniczne, intensywne mieszanie próbki nie wpływa na wynik indeksu ORP (*Vassiliou i wsp.*, 2021). Jednakże wyższe pH nasienia (≥8.0) jest związane z większymi różnicami między kolejnymi pomiarami sORP (*Garcia-Segura i wsp.*, 2020). Jak wskazują autorzy, może to sugerować, że w środowisku o wyższym pH reakcje redoks w próbce są bardziej dynamiczne lub mniej stabilne, co prowadzi do zwiększonej zmienności wyników. W związku z tym alkaliczne pH nasienia może utrudniać uzyskanie spójnych wyników zarówno sORP, jak i indeksu ORP.

Z kolei badania dotyczące stabilności wyników ORP w czasie od ejakulacji przynoszą niejednoznaczne wyniki. *Agarwal i wsp.* (2016) wykazali, że wynik indeksu ORP jest stabilny w ciągu 120 min od ejakulacji, podczas gdy *Vassiliou i wsp.* (2021) zaobserwowali spadek wartości indeksu w dwóch z 10 analizowanych próbek w przedziale czasu od 20 do 60 min. Chociaż, te ostatnie badania potwierdziły stabilność uzyskiwanych wyników pomiarów w ciągu 240 min od ejakulacji dla większości próbek, to Autorzy sugerują jednak wykonywanie oznaczeń w ciągu 20 min od ejakulacji. Wskazują oni także potrzebę dodatkowych badań, które potwierdzą jednoznacznie stabilność uzyskiwanego wyniku w dłuższym czasie.

(*Garcia-Segura et al.*, 2020); the authors suggest that in a higher pH environment, redox reactions within the sample may be more dynamic or less stable, leading to increased variability in the results. Therefore, the presence of alkaline semen pH may lower the consistency of both sORP and ORP index results.

The effect of time after ejaculation on the stability of ORP results is unclear. *Agarwal et al.* (2016) found the ORP index to remain stable within 120 minutes of ejaculation while *Vassiliou et al.* (2021) observed a decrease in two out of 10 samples within a 20–60 minute time frame. Although the latter data confirmed that most samples remained stable within 240 minutes post-ejaculation, the authors recommend performing measurements within 20 minutes after ejaculation. They also emphasize the need for further studies to definitively confirm the long-term stability of the results.

Kliniczne znaczenie oceny potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w diagnostyce zaburzeń męskiej płodności – przegląd badań
Clinical Significance of Oxidation-Reduction Potential Assessment in the Diagnosis of Male Infertility Disorders – A Review of Studies

Pierwsze publikacje naukowe dotyczące potencjału systemu MiOXSYS® jako narzędzia diagnostycznego do oceny OS w nasieniu zaczęły pojawiać się około 2016 r. Większość tych badań koncentrowała się na porównaniu wyników pomiaru indeksu ORP pomiędzy grupami mężczyzn o różnym statusie płodności (płodni vs. niepłodni) lub różnej jakości nasienia (mężczyźni z normozoospermią vs. mężczyźni z nieprawidłowościami parametrów nasienia). Dodatkowo opracowywano wartości odcięcia (ang. *cut-off values*), które umożliwiałyby identyfikację mężczyzn z OS oraz nieprawidłowymi parametrami nasienia, a także odróżnienie ich od mężczyzn z prawidłowymi wynikami, bez oznak OS (*Agarwal i wsp.*, 2017a; *Agarwal i wsp.*, 2017c; *Arafa i wsp.*, 2018; *Agarwal i wsp.*, 2019a).

W jednym z pierwszych, pilotażowych badań zrekrutowano 26 zdrowych ochotników z normozoospermią oraz 33 niepłodnych mężczyzn (*Agarwal i wsp.*, 2016). Wykazano, że wskaźnik ORP w nasieniu i plazmie nasiennej jest podwyższony u mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia, zwłaszcza w przypadku obniżonej ruchliwości plemników (<40%). Na podstawie analizy krzywej ROC (ang. *receiver operating characteristic curve*) zaproponowano wartości graniczne wskaźnika ORP: 1,48 mV/10^6 plemników/mL w nasieniu oraz 2,09 mV/10^6 plemników/mL w plazmie nasiennej, które mogłyby pomóc w identyfikacji próbek o nieprawidłowych

The first scientific publications on the potential of the MiOXSYS® system as a diagnostic tool for assessing OS in semen began to appear around 2016. Most of these studies focused on comparing ORP index values between groups of men with differing fertility status (fertile vs. infertile) or semen quality (men with normozoospermia vs. those with abnormal semen parameters). Additionally, efforts were made to establish optimal cut-off values for identifying men with OS and abnormal semen parameters and differentiating them from men with normal semen quality and no signs of OS (*Agarwal et al.*, 2017a; *Agarwal et al.*, 2017c; *Arafa et al.*, 2018; *Agarwal et al.*, 2019a).

One of the first pilot studies included 26 healthy volunteers with normozoospermia and 33 infertile men (*Agarwal et al.*, 2016). The ORP index in semen and seminal plasma was found to be elevated in men with abnormal semen parameters, particularly in cases of reduced sperm motility (<40%). The following cut-off values were proposed for the ORP index based on receiver operating characteristic (ROC) curve analysis: 1.48 mV/10^6 sperm/mL in semen and 2.09 mV/10^6 sperm/mL in seminal plasma; these could help identify samples with abnormal parameters, especially those with reduced

parametrach, szczególnie tych z obniżoną ruchliwością plemników (<40%). Niestety, zaproponowane wartości odcięcia charakteryzowały się niską dodatnią wartością predykcyjną (PPV, ang. *positive predictive value* – 45% w nasieniu i 46,7% w plazmie nasiennej), co najprawdopodobniej wynikało z ograniczonej liczby mężczyzn o potwierdzonej płodności w grupie kontrolnej (*Agarwal i wsp.*, 2016). W kolejnych latach przeprowadzono dalsze badania nad zastosowaniem systemu MiOXSYS® w praktyce klinicznej, szczególnie w wykrywaniu stresu oksydacyjnego jako potencjalnej przyczyny niepłodności męskiej (Tabela 1). Podobnie jak w przedstawionym powyżej pilotażowym badaniu, w każdym z kolejnych badań zaobserwowano istotnie wyższe wartości wskaźnika ORP w grupach badanych (obejmujących mężczyzn niepłodnych lub tych z nieprawidłowymi wynikami analizy nasienia) w porównaniu z grupami kontrolnymi. Na podstawie analizy krzywych ROC w badaniach tych ustalono wartości odcięcia wskaźnika ORP, które umożliwiały identyfikację zarówno mężczyzn niepłodnych, jak i przypadków nieprawidłowej jakości nasienia lub jego poszczególnych parametrów (t.j. obniżona ruchliwość plemników, obniżona całkowita liczba ruchliwych plemników, podwyższona fragmentacja DNA), wynikających prawdopodobnie z obecności OS w nasieniu (Tabela 1).

W jednym z największych dotychczasowych badań, obejmującym 2092 mężczyzn z dziewięciu krajów, system MiOXSYS®, przy wartości odcięcia ORP wynoszącej 1,34 mV/10^6 plemników/mL, wykazał wysoką czułość (98,1%) i dodatnią wartość predykcyjną (94,7%) w diagnozowaniu niepłodności męskiej na podstawie nieprawidłowych parametrów nasienia. Wyniki te potwierdzają skuteczność testu w identyfikacji przypadków z zaburzeniami jakości nasienia. Jednakże swoistość testu (40,6%) oraz negatywna wartość predykcyjna (66,6%) były znacznie niższe, co ogranicza jego zdolność do skutecznego wykluczania mężczyzn z normozoospermią (*Agarwal i wsp.*, 2019a).

W innych, podobnych badaniach o mniejszej liczbie uczestników, z zastosowaniem podobnych wartości odcięcia mieszczących się w zakresie 1,42–1,57 mV/10^6 plemników/mL, uzyskano wyniki wskazujące na wyższą swoistość testu (74–88%) w porównaniu z jego czułością (60–70%). We wszystkich tych przypadkach, z wyjątkiem jednego badania, stwierdzono bardzo wysoką dodatnią wartość predykcyjną (85–95%), co świadczy o dużej wiarygodności testu w potwierdzaniu obecności nieprawidłowości, które mogą być związane ze OS w nasieniu. Natomiast ujemna wartość predykcyjna była wysoce zmienna (24–85%), co ogranicza pewność wykluczenia obecności OS w przypadku wyniku negatywnego (*Agarwal i wsp.*, 2016; *Agarwal* i *Wang*, 2017; *Agarwal i wsp.*, 2017a, c). Potwierdza to fakt, że system MiOXSYS® jest bardziej przydatny jako narzędzie wspierające potwierdzanie obecności nieprawidłowości w diagnostyce męskiej niepłodności związanej z OS niż jako samodzielny test przesiewowy.

Tak więc, na podstawie wszystkich powyższych badań można stwierdzić, że wyniki wskaźnika ORP wskazujące

sperm motility (<40%). However, the proposed cut-off values were characterized by low positive predictive value (PPV; 45% in semen and 46.7% in seminal plasma), likely due to the limited number of men with confirmed fertility in the control group (*Agarwal et al.*, 2016).

In subsequent years, further studies evaluated the use of the MiOXSYS® system in clinical practice, particularly for detecting OS as a potential cause of male infertility (Table 1). Similar to the pilot study, these subsequent findings indicated significantly higher ORP index values in the experimental groups (including infertile men or those with abnormal semen analysis results) compared to control groups. Each study established ORP cut-off values using ROC curve analysis to identify infertile men and cases of abnormal semen quality or specific semen parameters (e.g., reduced sperm motility, decreased total motile sperm count, or increased DNA fragmentation), likely resulting from the presence of OS in semen (Table 1).

In one of the largest studies to date, involving 2,092 men from nine countries, the MiOXSYS® system demonstrated high sensitivity (98.1%) and positive predictive value (PPV, 94.7%) for diagnosing male infertility based on abnormal semen parameters, assuming an ORP cut-off value of 1.34 mV/10^6 sperm/mL. These results confirm the effectiveness of the test in identifying cases of impaired semen quality; however, its specificity (40.6%) and negative predictive value (NPV, 66.6%) were considerably lower, limiting its ability to reliably exclude men with normozoospermia (*Agarwal et al.*, 2019a).

Similar studies with smaller sample sizes yielded higher specificity (74–88%) compared to sensitivity (60–70%), using cut-off values ranging from 1.42 to 1.57 mV/10^6 sperm/mL. In all cases, except one, the PPV was very high (85–95%), highlighting its strong reliability when confirming abnormalities associated with OS in semen. However, the NPV was highly variable (24–85%), limiting the certainty of ruling out OS in cases with negative results (*Agarwal et al.*, 2016; *Agarwal* and *Wang*, 2017; *Agarwal et al.*, 2017a, c) This confirms that the MiOXSYS® system is more useful as a confirmatory tool for confirming abnormalities in the diagnosis of OS-related male infertility rather than as a standalone screening test.

Based on all the above studies, it can be concluded that ORP index results, indicating the presence of OS in semen, are highly likely to reflect actual pathology. As such, the MiOXSYS® system appears to be a valuable diagnostic tool in cases of suspected male factor infertility.

A meta-analysis of seven studies on the diagnostic value of ORP in male infertility conducted by *Tan et al.* (2024) found it to demonstrate high effectiveness in detecting OS-related infertility,

Tabela 1. Przegląd badań nad zastosowaniem systemu MiOXSYS jako narzędzia do oceny stresu oksydacyjnego w diagnostyce zaburzeń męskiej płodności

Lp.	Piśmiennictwo	Badana populacja	Główne wyniki
1	*Agarwal i wsp.* (2016)	Grupa badana – mężczyźni z niepłodnych par gdzie przyczyną zaburzeń płodności był czynnik męski (n = 33) Grupa kontrolna – zdrowi ochotnicy z normozoospermią (n = 26) Uczestników badania podzielono także na grupy z prawidłową (≥40%) i nieprawidłową ruchliwością całkowitą plemników (<40%) Normalizacja sORP względem koncentracji plemników	Wyniki indeksu ORP w nasieniu (mV/10^6 plemników/mL) w grupie badanej były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną (średnia ±SEM: 17,39 ±13,33 vs. 1,04 ±0,26) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,48 mV/10^6 plemników/mL w nasieniu pozwala na różnicowanie mężczyzn z dobrą (≥40%) i niską ruchliwością plemników (<40%): – czułość: 60% – specyficzność: 75% – AUC: 0,648 – dodatnia wartość predykcyjna: 45% – ujemna wartość predykcyjna: 84,6% Wartość odcięcia wskaźnika ORP 2,09 mV w plazmie nasienia pozwala na różnicowanie mężczyzn z dobrą (≥40%) i niską ruchliwością plemników (<40%): – czułość 46,7% – specyficzność 81,8% – AUC: 0,615 – dodatnia wartość predykcyjna: 46,7% – ujemna wartość predykcyjna: 81,8
2	*Agarwal i Wang* (2017)	Grupa badana – mężczyźni niepłodni (n = 194) – oligozoospemia (n = 92) – astenozoospermia (n = 102) – teratozoospermia (n = 95) – co najmniej 1 nieprawidłowy parametr (n = 152) Grupa kontrolna – zdrowi mężczyźni z normozoospermią o nieudokumentowanej (n = 34) i udokumentowanej płodności (n = 15) Normalizacja sORP względem koncentracji plemników	Wyniki wskaźnika ORP (mV/10^6 plemników/mL) w grupie mężczyzn niepłodnych z co najmniej jednym nieprawidłowym parametrem nasienia były wyższe w porównaniu z wynikami mężczyzn z normozoospermią (mediana: 3,76 vs. 0,74) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,57 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z co najmniej jednym nieprawidłowym parametrem nasienia: – czułość: 70,4% – specyficzność: 88,1 % – AUC: 0,809 – dodatnia wartość predykcyjna: 95,5% – ujemna wartość predykcyjna: 45,1% Wartość odcięcia wskaźnika ORP 2,59 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z oligozoospermią (<15 mln/mL) w nasieniu: – czułość: 88% – specyficzność: 91,2% – AUC: 0,754 – dodatnia wartość predykcyjna: 90,0% – ujemna wartość predykcyjna: 89,7%
3	*Agarwal i wsp.* (2017c)	Grupa badana – mężczyźni niepłodni (n = 106) Grupa kontrolna – zdrowi mężczyźni z normozoospermią o nieudokumentowanej (n = 36) i udokumentowanej płodności (n = 15) Normalizacja sORP względem koncentracji plemników	Wyniki wskaźnika ORP (mV/10^6 plemników/mL) były wyższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolą (średnia ±SD: 6,22 ±1,10 vs. 1,59 ±0,29) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,36 (mV/10^6 plemników/mL) pozwala na różnicowanie mężczyzn z prawidłowym i nieprawidłowym wynikiem badania nasienia: – czułość: 69,6% – specyficzność: 83,1% – AUC: 0,770 – dodatnia wartość predykcyjna: 85,3% – ujemna wartość predykcyjna: 65,9%
4	*Agarwal i wsp.* (2017a)	Grupa badana – mężczyźni niepłodni (n = 594) Grupa kontrola – płodni dawcy (n = 101) Dwa centra – Cleveland Clinic, Chicago, USA – Hamad Medical Corporation, Doha, Katar Normalizacja sORP względem koncentracji plemników	Wyniki wskaźnika ORP (mV/10^6 plemników/mL) były wyższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolą (mediana: 2,27 vs. 0,85) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,42 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn niepłodnych i mężczyzn z grupy kontrolnej – czułość: 60,6% – specyficzność: 74,3% – AUC: 0,703 – dodatnia wartość predykcyjna: 93,3% – ujemna wartość predykcyjna: 24,3%
5	*Arafa i wsp.* (2018)	Grupa badana – mężczyźni niepłodni – potwierdzony męski czynnik niepłodności pary (n = 365) Grupa kontrola – mężczyźni płodni (n = 50) Normalizacja sORP względem koncentracji plemników	Wyniki wskaźnika ORP (mV/10^6 plemników) w grupie mężczyzn niepłodnych były wyższe w porównaniu z wynikami mężczyzn płodnych (średnia ±SD: 5,0 ±0,56 vs. 1,26 ±0,15) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,38 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z co najmniej jednym nieprawidłowym parametrem nasienia: – czułość: 63,3% – specyficzność: 87,8 % – AUC: 0,780 – dodatnia wartość predykcyjna: 97,6% – ujemna wartość predykcyjna: 23,2% Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,41 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn niepłodnych i płodnych: – czułość: 57,3% – specyficzność: 78,0% – AUC: 0,754 – dodatnia wartość predykcyjna: 95,0% – ujemna wartość predykcyjna: 20,0%

Lp.	Piśmiennictwo	Badana populacja	Główne wyniki
6	*Agarwal i wsp.* (2018)	Grupa badana – mężczyźni niepłodni – potwierdzony męski czynnik niepłodności pary (n = 293) Grupa kontrolna – zdrowi mężczyźni z normozoospermią o udokumentowanej płodności (n = 15) Normalizacja sORP względem koncentracji plemników	Wyniki wskaźnika ORP (mV/10^6 plemników/mL) były wyższe w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolą płodnych mężczyzn (średnia ±SD: 11,1 ±31,6 vs. 1,5 ±1,3) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 2,63 (mV/10^6 plemników) pozwala na różnicowanie mężczyzn niepłodnych od mężczyzn z grupy kontrolnej: – czułość: 40,4% – specyficzność: 93,3% – AUC: 0,596 – dodatnia wartość predykcyjna: 99,2% – ujemna wartość predykcyjna: 7,4%
7	*Agarwal i wsp.* (2019a)	Grupa badana – mężczyźni z kliniki leczenia niepłodności (n = 2092) – z nieprawidłowym wynikiem badania nasienia (n = 1893) – z normozoospermia (n = 199) Badanie wieloośrodkowe (9 centrów) Normalizacja sORP względem koncentracji plemników.	Wyniki wskaźnika ORP (mV/10^6 plemników/mL) były znamiennie wyższe w grupie mężczyzn z nieprawidłowym wynikiem nasienia w porównaniu z grupą mężczyzn z normozoospermią (średnia ±SD: 5,08 ±14,24 vs. 0,88 ±1,64) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,34 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z nieprawidłowym wynikiem badania nasienia (niepłodnych) od mężczyzn z grupy kontrolnej: – czułość: 98,1% – specyficzność: 40,6% – AUC: 0,765 – dodatnia wartość predykcyjna: 94,7% – ujemna wartość predykcyjna: 66,8%
8	*Elbardisi i wsp.* (2020)	Grupa badana – mężczyźni z kliniki leczenia niepłodności (n = 4068): – wyniki tylko ORP (n = 3968) – wyniki tylko SDF (n = 1147) – wyniki ORP i SDF (n = 1068) Normalizacja wyników sORP względem: – koncentracji plemników – koncentracji plemników ruchliwych – motORP	Podział pacjentów względem wyników SDF (wartość graniczna 30%): – wyniki wskaźnika ORP (mV/10^6 plemników/mL) były wyższe u mężczyzn z wysokim wynikami SDF w porównaniu z mężczyznami z niskim wynikami SDF (średnia: 4,1 vs. 2,5) Podział pacjentów względem wyników wskaźnika ORP (wartość graniczna 1,34): – wyniki SDF były wyższe u mężczyzn z wysokimi wynikami wskaźnika ORP w porównaniu z mężczyznami z wynikami wskaźnika poniżej wartości granicznej (średnia: 30,9% vs. 25,1%) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,77 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z wysokim wynikiem SDF: – czułość: 63,5% – specyficzność: 56,3% – AUC: 0,623 – dodatnia wartość predykcyjna: 37,3% – ujemna wartość predykcyjna: 79,1% Wartość odcięcia wskaźnika ORP 1,77 mV/10^6 plemników/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z normozoospermią: – czułość: 57,33% – specyficzność: 78,6% – AUC: 0,771 – dodatnia wartość predykcyjna: 16,8% – ujemna wartość predykcyjna: 96,1% Wartość odcięcia wskaźnika motORP 4,96 mV/10^6 plemników ruchliwych/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z wysokim wynikiem SDF: – czułość: 61,9% – specyficzność: 71,5% – AUC: 0,719 – dodatnia wartość predykcyjna: 47,1% – ujemna wartość predykcyjna: 82,1% Wartość odcięcia wskaźnika motORP 4,96 mV/10^6 plemników ruchliwych/mL pozwala na różnicowanie mężczyzn z normozoospermią: – czułość: 82,7% – specyficzność: 68,5% – AUC: 0,826 – dodatnia wartość predykcyjna: 16,5% – ujemna wartość predykcyjna: 98,1%
9	*Majzoub i wsp.* (2020)	Grupa badana: – niepłodni mężczyźni (n = 1168) Grupa kontrolna: – mężczyźni płodni (n = 100) Normalizacja wyników sORP względem koncentracji plemników.	Wyniki wskaźnika ORP są znamiennie wyższe w grupie mężczyzn niepłodnych w porównaniu z mężczyznami płodnymi (mediana: 1,8 vs. 0,9) Wartość odcięcia wskaźnika ORP 2,34 (mV/10^6 plemników/mL) pozwala na różnicowanie mężczyzn z TMSC >20 mln ruchliwych plemników: – czułość: 82,9% – specyficzność: 82,8% – AUC: 0,900 – dodatnia wartość predykcyjna: 91,5% – ujemna wartość predykcyjna: 68,5%
10	*Garcia-Segura i wsp.* (2020)	Grupa badana: – mężczyźni z niepłodnością idiopatyczną (n = 42) Fragmentacja DNA plemników oceniana metoda TUNEL i COMET Kondensacja chromatyny oceniana metoda z chromomycyną A3 (CMA3), wykorzystywaną do oceny zaburzeń protaminacji.	Nie wykazano znamiennej korelacji między testami oceniającymi fragmentację DNA (TUNEL, COMET) a wskaźnikami ORP, ORP, pH-ORP Wykazano znamienną ujemną korelację między odsetkiem plemników CMA3-pozytywnych (nieprawidłowa protaminacja chromatyny) a analizowanymi wskaźnikami: ORP (–0,394), ORP-V (–0,545) i ORP-P (–0,337)

Lp.	Piśmiennictwo	Badana populacja	Główne wyniki
		Normalizacja wyników sORP względem: – koncentracji plemników – ORP – lepkością nasienia – ORP-V (mV/centypuaz) – pH nasienia – ORP-P (mV/U pH)	
11	*Gill i wsp.*. (2021)	Grupy badana: – mężczyźni niepłodni (n = 166) z żylakami powrózków nasiennych (n = 71) bez żylaków powrózków nasiennych (n = 95) Grupy kontrolne: – mężczyźni płodni o udokumentowanej płodności (n = 64) – zdrowi ochotnicy z normozoospermią o nieznanym statusie płodności (n = 105) Normalizacja wyników sORP względem koncentracji plemników.	Wartość wskaźnika ORP była istotnie wyższa w obu grupach niepłodnych mężczyzn (z i bez żylaków powrózków nasiennych; odpowiednio mediana: 3,99 mV/10^6 plemników/mL i 7,23 mV/10^6 plemników/mL) w porównaniu do mężczyzn z normozoospermią (mediana: 1,29 mV/10^6/mL) i mężczyzn o udowodnionej płodności (mediana: 0,81 mV/10^6/mL) Częstość występowania wyników wskaźnika ORP powyżej dolnej wartości referencyjnej >1,37 mV/10^6/mL w obu grupach mężczyzn niepłodnych wynosiła >80% z kolei w grupie mężczyzn z normozoospermią – 47% a w grupie mężczyzn płodnych – 19% Iloraz szans (OR) na wystąpienie wskaźnika ORP >1,37 mV/10^6 plemników/mL w grupie mężczyzn niepłodnych z żylakami był 5,3-krotnie wyższy w porównaniu z grupą ochotników z normozoospermią oraz 20,4-krotnie wyższy w porównaniu z grupą mężczyzn płodnych Iloraz szans (OR) na wystąpienie wskaźnika ORP >1,37 mV/10^6 plemników/mL w grupie mężczyzn niepłodnych bez żylaków był 6,9-krotnie wyższy w porównaniu z grupą ochotników z normozoospermią oraz 26,0-krotnie wyższy w porównaniu z grupą mężczyzn płodnych
12	*Gill i wsp.* (2022)	Grupy badane: – mężczyźni niepłodni (n = 124) z leukocytospermią (n = 47) bez leukocytospermii (n = 77) Grupa kontrolna: – ochotnicy o udokumentowanej płodności bez leukocytospermii (n = 80); grupa kontrolna Normalizacja wyników sORP względem koncentracji plemników.	Wartość wskaźnika ORP była istotnie wyższa w obu grupach mężczyzn niepłodnych (z i bez leukocytospermii, odpowiednio mediana 2,05 mV/10^6 plemników/mL i 4,90 mV/10^6 plemników/mL) w porównaniu z grupą mężczyzn płodnych (mediana 0,62 mV/10^6 plemników/mL) Na podstawie krzywej ROC została wyznaczona wartość odcięcia dla wskaźnika ORP (1,40 mV/10^6 plemników/mL) różnicująca mężczyzn niepłodnych od mężczyzn płodnych: – czułość: 77% – specyficzność: 86% – AUC: 0,857 Częstość występowania wyników wskaźnika ORP >1,40 mV/10^6 plemników/mL była wyższa w grupie mężczyzn niepłodnych (z i bez leukocytospermii, odpowiednio 67% i 84%) w porównaniu z grupą mężczyzn płodnych (16%). Iloraz szans (OR) na wystąpienie wskaźnika ORP >1,40 mV/10^6 plemników/mL w grupie mężczyzn niepłodnych z i bez leukocytospermii był wyższy (odpowiednio 10-krotnie i 28-krotnie) w porównaniu z grupą mężczyzn płodnych.
13	*Henkel i wsp.* (2022)	Grupa badana: – pary zakwalifikowane do procedury ICSI, z wykorzystaniem własnych gamet; oceniano tylko 1 cykl (n = 144) Normalizacja wyników sORP względem koncentracji plemników.	Wyniki wskaźnika ORP statystycznie znamiennie korelowały ujemnie ze: – wskaźnikiem zapłodnienia (r = –0,267) – wskaźnikiem rozwoju blastocysty (r = –0,432) – wskaźnikiem implantacji/ciąży klinicznej (r= –0,305) – urodzeniem żywego dziecka (r = –0,366) Wyniki wskaźnika ORP znamiennie korelowały dodatnio z fragmentacja DNA (metoda TUNEL; r = 0,665) oraz wiekiem mężczyzny (r = 0,268) Na podstawie krzywej ROC zostały wyznaczone wartości odcięcia sORP: ≤ 0,709 dla uzyskania ≥ 80% zapłodnionych komórek – AUC: 0,652 – czułość: 75% – specyficzność: 57% – dodatnia wartość predykcyjna: 65% – ujemna wartość predykcyjna: 69% ≤ 0,53 dla uzyskania ≥60% zarodków osiągających stadium blastocysty – AUC: 0,794 – czułość: 66% – specyficzność: 83% – dodatnia wartość predykcyjna: 90% – ujemna wartość predykcyjna: 50% ≤ 0,465 dla wskaźnika sukcesu implantacji/ciąży klinicznej – AUC: 0,680 – czułość: 63% – specyficzność: 71% – dodatnia wartość predykcyjna: 60% – ujemna wartość predykcyjna: 74% ≤ 0,393 dla urodzenia żywego dziecka – AUC: 0,728 – czułość: 62% – specyficzność: 77% – dodatnia wartość predykcyjna: 52% – ujemna wartość predykcyjna: 83% Wieloczynnikowa regresja logistyczna wykazała, że wartość wskaźnika ORP ≤0,51 mV/10^6 plemników/mL to wartość optymalna, przy której uzyskano najwyższą skuteczność predykcyjną w przewidywaniu korzystnych wyników procedury ICSI (zapłodnienie, rozwój blastocysty, implantacja oraz urodzenie żywego dziecka)

Lp.	Piśmiennictwo	Badana populacja	Główne wyniki
14	*Kavoussi i wsp.* (2022)	Grupa badana: – mężczyźni z żylakami powrózka nasiennego (n = 49) – wyniki wskaźnika ORP i podstawowego badania nasienia uzyskane przed i 3 m-ce po operacji usunięcia żylaków Normalizacja wyników sORP względem koncentracji plemników.	Średnia wartość wskaźnika ORP zmniejszyła się z 4,73 mV/10^6 plemników/mL przed operacją do 2,03 mV/10^6 plemników/mL po operacji Po operacji uzyskano także poprawę dla parametrów podstawowego badania nasienia (ruchliwość postępowa, całkowita, liczba plemników) oraz indeksu fragmentacji DNA
15	*Panner Selvam i wsp.* (2022)	Meta analiza – ocena diagnostycznej wartości wskaźnika ORP w kontekście fragmentacji DNA plemnika (ocena korelacji między obu parametrami) – 7 publikacji: w 5 fragmentacja DNA plemnika oceniana metodą dyspersji chromatyny (SCD), w 1 metodą SCSA oraz w jednym równolegle metoą TUNEL i metoda kometkową (alkaliczną) – łączna liczba przypadków – 3491	Wykazano dodatnią umiarkowaną skumulowaną korelację między wskaźnikiem ORP a fragmentacją DNA plemników (r = 0,24) Analiza w podgrupach: – r = 0,23 – skumulowany współczynnik korelacji, przy ocenie fragmentacji metoda SCD – r = 0,29 – skumulowany współczynnik korelacji, przy ocenie fragmentacji DNA innymi metodami Wykazano umiarkowany poziom heterogenności między badaniami
16	*Gill i wsp* (2024)	Grupa badana: – mężczyźni z nieprawidłowymi wynikami badania nasienia (n=179) z astenozoospemią (n = 71) bez astenozoospermii (n = 108) Grupa kontrolna: – mężczyźni z normozoospermią (n = 98) o udokumentowanej płodności (n = 43) potencjalnie płodni (n = 55) Normalizacja wyników sORP względem koncentracji plemników.	Wyniki wskaźnika ORP były znamiennie statystycznie wyższe w grupie mężczyzn o nieprawidłowych wynikach nasienia z asthenozoospermią w porównaniu z grupą o nieprawidłowych wynikach nasienia bez asthenozoospermii i grupą kontrolną (mediana odpowiednio: 4,16; 1,23 i 0,99 mV/10^6 plemników/mL) Częstość występowania nieprawidłowego wskaźnika ORP (>1,37 mV/10^6 plemników/mL) była najwyższa w grupie mężczyzn z asthenozoospermią w porównaniu z grupa mężczyzn bez astenozoospermii i grupą kontrolną (odpowiednio 75%, 47%, 35%) Częstość występowania nieprawidłowego wyniku fragmentacji DNA plemnika (>20%) była najwyższa w grupie mężczyzn z astenozoospermią w porównaniu z grupa mężczyzn bez astenozoospermii i grupą kontrolną (odpowiednio 62%, 37%, 13%). Ryzyko wystąpienia podwyższonego wskaźnika ORP (>1,37 mV/10^6 plemników/mL) było 6-krotnie wyższe w grupie z astenozoospermą w porównaniu do grupy kontrolnej i ponad 3-krotnie wyższe w porównaniu z grupą bez astenozoospermii. Ryzyko wystąpienia fragmentacji DNA >20% było 10-krotnie wyższe w grupie z astenozoospermą w porównaniu do grupy kontrolnej i ponad 3-krotnie wyższe w porównaniu z grupą bez astenozoospermii.
17	*Niu i wsp.* (2023)	Grupa badana: – pary zakwalifikowane do procedury klasycznego IVF (n = 136) Badanie dotyczyło pomiaru ORP w medium po inkubacji (4h) gamet podczas procedury IVF (świeży transfer embrionu, n = 105) Grupę podzielono na 4 podgrupy w zależności od uzyskanego wyniku sORP (podział na kwartale)	Zakres sORP (mV) w medium hodowlanym: Grupa I (n = 34) – 191,5–228,4 mV Grupa II (n = 34) – 228,7–235,3 mV Grupa III (n = 34) – 235,4–242,7 mV Grupa IV (n = 34) – 242,8–295,3 mV Liczba procedur (pierwszych świeżych transferów) w grupach: Grupa I (n = 23) Grupa II (n = 25) Grupa III (n = 28) Grupa IV (n = 29) Optymalny zakres sORP (mV) dla wyników IVF mieści się w przedziale od 228,7 do 235,3 mV (Grupa II): – wskaźniki żywych urodzeń – 32% w grupie II w porównaniu z 3,6% w grupie III (znamienne statystycznie) oraz 8,7% w grupie I i 13,8% w grupie IV – uzyskanie klinicznej ciąży – 32% w grupie II w porównaniu z 3,6% w grupie III (znamienne statystycznie) oraz 8,7% w grupie I i 13,8% w grupie IV – uzyskanie biochemicznej ciąży – 36,0% w grupie II w porównaniu do 3,6% w Grupie III (znamienne statystycznie) oraz 13% w grupie I i 17,2% w grupie IV – wskaźnik implantacji – 31,3% w grupie II w porównaniu do 2,7% w Grupie III (znamienne statystycznie) oraz 6,7% w grupie I i 11,8% w grupie IV Zbyt wysokie i zbyt niskie wartości ORP były powiązane z gorszymi wynikami procedury IVF.
18	*Tan i wsp.* (2024)	Meta analiza – ocena diagnostycznej wartości wskaźnika ORP w kontekście męskiej zaburzeń męskiej płodności – 7 publikacji – łączna liczba przypadków – 6578	Pomiar wskaźnika ORP ma wysoka czułość i umiarkowana specyficzność jako narzędzie diagnostyczne w ocenie męskiej niepłodności: – skumulowana czułość, wspólnie dla wszystkich włączonych badań: 81% – skumulowana swoistość, wspólnie dla wszystkich włączonych badań: 66% – AUC: 0,8097 – pozytywny współczynnik wiarygodności (PLR) wynosił 2,57 – negatywny współczynnik wiarygodności (NLR) wynosił 0,28 Wykazano wysoki poziom heterogenności między do analizy badań .

AUC – powierzchnia pod krzywą; CMA3 – chromomycyna A3; COMET – metoda kometkowa ; OR – iloraz szans; ORP – potencjał oksydacyjno–redukcyjny; SCD – test dyspersji chromatyny; SD – odchylenie standardowe, SEM – błąd standardowy średniej, SDF – fragmentacja DNA plemników; sORP – nieznormalizowany (static) ORP, TMSC – całkowita liczba ruchliwych plemników; TUNEL – znakowanie końców nacięć nici DNA przy użyciu terminalnej transferazy deoksynukleotydowej

Table 1. Overview of Studies on the use of the MiOXSYS® System as a tool for assessing oxidative stress in the diagnosis of male infertility disorders

No	References	Study population	Main results
1	*Agarwal et al.* (2016)	Study Group – men from infertile couples where the cause of infertility was the male factor (n = 33) Control Group – healthy volunteers with normozoospermia (n = 26) Participants were also divided into groups based on total sperm motility: – normal motility (≥ 40%) – abnormal motility (< 40%) Normalization of sORP to sperm concentration	ORP indices in semen (mV/10^6 sperm/mL) in the study group were higher compared to the control group (mean ±SEM, 17.39 ±13.33 vs. 1.04 ±0.26). An ORP cut-off value of 1.48 mV/10^6 sperm/mL in semen allows differentiation between good motility (≥40%) and low motility (<40%): – Sensitivity: 60% – Specificity: 75% – AUC: 0.648 – Positive predictive value: 45% – Negative predictive value: 84.6% An ORP cut-off value of 2.09 mV in seminal plasma allows differentiation between good motility (≥40%) and low motility (<40%): – Sensitivity: 46.7% – Specificity: 81.8% – AUC: 0.615 – Positive predictive value: 46.7% – Negative predictive value: 81.8%
2	*Agarwal i Wang* (2017)	Study Group – infertile men (n = 194) – oligozoospemia (n = 92), – asthenozoospermia (n = 102) – teratozoospermia (n = 95) – at least one abnormal semen result (n = 152) Control Group – healthy men with normozoospermią and proven (n = 34) and unproven fertility (n = 15) Normalization of sORP to sperm concentration	Infertile men with at least one abnormal semen parameter demonstrated higher ORP indices (mV/10^6 sperm) than those with normozoospermia (median: 3.76 vs. 0.74). An ORP cut-off value of 1.57 mV/10^6 sperm/mL allows identification of men with at least one abnormal semen parameter: – Sensitivity: 70.4% – Specificity: 88.1% – AUC: 0.809 – Positive predictive value: 95.5% – Negative predictive value: 45.1% An ORP cut-off value of 2.59 mV/10^6 sperm/mL allows identification of oligozoospermia (<15 million/mL) in semen: – Sensitivity: 88% – Specificity: 91.2% – AUC: 0.754 – Positive predictive value: 90.0% – Negative predictive value: 89.7%
3	*Agarwal et al.* (2017c)	Study Group – infertile men (n = 106) Control Group – healthy men with normozoospermią and proven (n = 36) and unproven fertility (n = 15) Normalization of sORP to sperm concentration	ORP indices (mV/10^6 sperm/mL) were higher in the study group compared to the control group (mean ±SD: 6.22 ±1.10 vs. 1.59 ±0.29). An ORP cut-off value of 1.36 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between normal and abnormal semen analysis results: – Sensitivity: 69.6% – Specificity: 83.1% – AUC: 0.770 – Positive predictive value: 85.3% – Negative predictive value: 65.9%
4	*Agarwal et al.* (2017a)	Study Group – infertile men (n = 594) Control Group – fertile donors (n = 101) Two centres: – Cleveland Clinic, Chicago, USA – Hamad Medical Corporation, Doha, Katar Normalization of sORP to sperm concentration	ORP indices (mV/10^6 sperm) were higher in the study group than the control group (median: 2.27 vs. 0.85). An ORP cut-off value of 1.42 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between infertile men and men in the control group: – Sensitivity: 60.6% – Specificity: 74.3% – AUC: 0.703 – Positive predictive value: 93.3% – Negative predictive value: 24.3%
5	*Arafa et al.* (2018)	Study Group – infertile men – confirmed male factor infertility (n = 365) Control Group – fertile men (n = 50) Normalization of sORP to sperm concentration	ORP indices (mV/10^6 sperm) were higher among infertile men than fertile men (mean ±SD: 5.0 ±0.56 vs. 1.26 ±0.15). An ORP cut-off value of 1.38 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between men with at least one abnormal semen parameter: – Sensitivity: 63.3% – Specificity: 87.8% – AUC: 0.780 – Positive predictive value: 97.6% – Negative predictive value: 23.2% An ORP cut-off value of 1.41 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between infertile and fertile men: – Sensitivity: 57.3% – Specificity: 78.0% – AUC: 0.754 – Positive predictive value: 95.0% – Negative predictive value: 20.0%

No	References	Study population	Main results
6	*Agarwal et al.* (2018)	Study Group – infertile men – confirmed male factor infertility (n = 293) Control Group – healthy men with normozoospermią and proven (n = 15) Normalization of sORP to sperm concentration	ORP indices (mV/10^6 sperm/mL) were higher in the study group compared to the control group of fertile men (mean ±SD: 11.1 ±31.6 vs. 1.5 ±1.3) An ORP cut-off value of 2.63 mV/10^6 sperm allows differentiation between infertile men and men in the control group: – Sensitivity: 40.4% – Specificity: 93.3% – AUC: 0.596 – Positive predictive value: 99.2% – Negative predictive value: 7.4%
7	*Agarwal et al.* (2019a)	Study Group – men from the infertility clinic (n = 2092) – with abnormal semen analysis (n = 1893) – with normozoospermia (n = 199) Multicenter study (9 centers) Normalization of sORP to sperm concentration.	ORP indices (mV/10^6 sperm/mL) were significantly higher among men with abnormal semen analysis results than those with normozoospermia (mean ±SD: 5.08 ±14.24 vs. 0.88 ±1.64). An ORP cut-off value of 1.34 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between men with abnormal semen analysis results (infertile) and men in the control group: – Sensitivity: 98.1% – Specificity: 40.6% – AUC: 0.765 – Positive predictive value: 94.7% – Negative predictive value: 66.8%
8	*Elbardisi et al.* (2020)	Study Group – men from the infertility clinic (n = 4068): – ORP results only (n = 3968) – SDF results only (n = 1147) – ORP and SDF results (n = 1068) Normalization of sORP to: – sperm concentration – concentration of motile sperm – motORP	Division of patients based on SDF results (threshold value: 30%): – ORP indices (mV/10^6 sperm/mL) were higher in men with high SDF compared to men with low SDF (mean: 4.1 vs. 2.5). Division of patients based on ORP indices (threshold value: 1.34): – SDF results were higher in men with high ORP indices compared to men with ORP index values below the threshold (mean: 30.9% vs. 25.1%). An ORP cut-off value of 1.77 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between men with high SDF results: – Sensitivity: 63.5% – Specificity: 56.3% – AUC: 0.623 – Positive predictive value: 37.3% – Negative predictive value: 79.1% An ORP cut-off value of 1.77 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between men with normozoospermia: – Sensitivity: 57.33% – Specificity: 78.6% – AUC: 0.771 – Positive predictive value: 16.8% – Negative predictive value: 96.1% A motORP cut-off of 4.96 mV/10^6 motile sperm/mL allows differentiation between men with high SDF results: – Sensitivity: 61.9% – Specificity: 71.5% – AUC: 0.719 – Positive predictive value: 47.1% – Negative predictive value: 82.1% A motORP cut-off value of 4.96 mV/10^6 motile sperm/mL allows differentiation between men with normozoospermia: – Sensitivity: 82.7% – Specificity: 68.5% – AUC: 0.826 – Positive predictive value: 16.5% – Negative predictive value: 98.1%
9	*Majzoub et al.* (2020)	Study Group – infertile men (n = 1168) Control Group: – fertile men (n = 100) Normalization of sORP to sperm concentration.	ORP indices are significantly higher in infertile men compared to fertile men (Median: 1.8 vs. 0.9). An ORP cut-off value of 2.34 mV/10^6 sperm/mL allows differentiation between men with TMSC > 20 million motile sperm: – Sensitivity: 82.9% – Specificity: 82.8% – AUC: 0.900 – Positive predictive value: 91.5% – Negative predictive value: 68.5%
10	*Garcia-Segura et al.* (2020)	Study Group – men with idiopathic infertility (n = 42) Sperm DNA fragmentation assessed using the TUNEL and COMET methods. Chromatin condensation assessed using the chromomycin A3 (CMA3) method, evaluating abnormal protamination	No significant correlation was found between DNA fragmentation tests (TUNEL, COMET) and the ORP indices: ORP, ORP-V, and ORP-P. A significant negative correlation was observed between the percentage of CMA3-positive sperm (indicating abnormal chromatin protamination) and the analyzed indices: ORP (-0.394), V-ORP (-0.545), and pH-ORP (-0.337)

No	References	Study population	Main results
		Normalization of sORP to: – sperm concentration – semen viscosity – ORP-V (mV/centypuaz) – semen pH – ORP-P (mV/U pH)	
11	*Gill et al.*. (2021)	Study Group – infertile men (n = 166) with varicocele (n = 71) without varicocele (n = 95) Control Group: – fertile men with proven fertility (n = 64) – healthy volunteers with normozoospermia and unknown fertility status (n = 105) Normalization of sORP to sperm concentration.	The ORP index value was significantly higher in both groups of infertile men (with and without varicocele; median: 3.99 mV/10^6 sperm/mL and 7.23 mV/10^6 sperm/mL, respectively) compared to men with normozoospermia (median: 1.29 mV/10^6 sperm/mL) and men with proven fertility (median: 0.81 mV/10^6 sperm/mL). The frequency of ORP index values above the lower reference limit (>1.37 mV/10^6 sperm/mL) was >80% in both groups of infertile men, compared to 47% in the normozoospermic group and 19% in the fertile group. Odds ratio (OR): – The odds of having an ORP index >1.37 mV/10^6 sperm/mL in the group of infertile men with varicocele were 5.3 times higher compared to normozoospermic volunteers and 20.4 times higher compared to fertile men. – The odds of having an ORP index >1.37 mV/10^6 sperm/mL in the group of infertile men without varicocele were 6.9 times higher compared to normozoospermic volunteers and 26.0 times higher compared to fertile men.
12	*Gill et al.* (2022)	Study Group – infertile men (n = 124) with leukocytospermi (n = 47) without leukocytospermi (n = 77) Control Group: – volunteers with documented fertility and without leukocytospermia (n = 80) Normalization of sORP to sperm concentration.	Both groups of infertile men, *viz*. those with leukocytospermia, (median: 2.05 mV/10^6 sperm/mL) and those without (4.90 mV/10^6 sperm/mL), demonstrated significantly higher ORP index than the fertile men (median: 0.62 mV/10^6 sperm/mL). Based on the ROC curve, an ORP cut-off value of 1.40 mV/10^6 sperm/mL was found to differentiate infertile men from fertile men: – Sensitivity: 77% – Specificity: 86% – AUC: 0.857 The frequency of ORP index values >1.40 mV/10^6 sperm/mL was higher in the group of infertile men (with and without leukocytospermia, 67% and 84%, respectively) compared to the group of fertile men (16%). In infertile men, the odds ratio (OR) of having an ORP index >1.40 mV/10^6 sperm/mL was 10 times higher among those with leukocytospermia and 28 times higher among those without, compared to a group of fertile men.
13	*Henkel et al.* (2022)	Study Group – couples qualified for the ICSI procedure using their own gametes; only one cycle was evaluated (n = 144) Normalization of sORP to sperm concentration.	ORP indices were significantly negatively correlated with: – fertilization rate (r = –0.267) – blastocyst development rate (r = –0.432) – implantation/clinical pregnancy rate (r = –0.305) – live birth rate (r = –0.366) ORP indices were significantly positively correlated with sperm DNA fragmentation (TUNEL method; r = 0.665) and male age (r = 0.268). Based on the ROC curve, the following sORP cut-off values were determined: ≤ 0.709 for a fertilization rate ≥ 80% – AUC: 0.652 – sensitivity: 75% – specificity: 57% – positive predictive value: 65% – negative predictive value: 69% ≤ 0.53 for a blastocyst development rate ≥ 60% – AUC: 0.794 – sensitivity: 66% – specificity: 83% – positive predictive value: 90% – negative predictive value: 50% ≤ 0.465 for implantation/clinical pregnancy success – AUC: 0.680 – sensitivity: 63% – specificity: 71% – positive predictive value: 60% – negative predictive value: 74% ≤ 0.393 for live birth – AUC: 0.728 – sensitivity: 62% – specificity: 77% – positive predictive value: 52% – negative predictive value: 83% Multivariate logistic regression found the optimal threshold to be an ORP index of ≤0.51 mV/10^6 sperm/mL; this provided the highest predictive accuracy for favorable outcomes in the ICSI procedure (fertilization, blastocyst development, implantation, and live birth)

No	References	Study population	Main results
14	*Kavoussi et al.* (2022)	Study Group – men with varicocele (n = 49) – ORP index and basic semen analysis results obtained before and 3 months after varicocelectomy Normalization of sORP to sperm concentration..	The mean ORP index value decreased from 4.73 mV/10^6 sperm/mL before surgery to 2.03 mV/10^6 sperm/mL after surgery. Postoperative improvements were also observed in basic semen analysis parameters (progressive motility, total motility, sperm count) and DNA fragmentation index.
15	*Panner Selvam et al.* (2022)	Meta-analysis – evaluation of the diagnostic value of ORP index in the context of sperm DNA fragmentation (assessment of the correlation between both parameters) – 7 publications: in 5 studies, sperm DNA fragmentation was assessed using the sperm chromatin dispersion (SCD) method; in 1 study, the SCSA method was used; and in 1 study, both the TUNEL method and the comet assay (alkaline version) were used simultaneously – Total number of cases – 3491	A moderate positive cumulative correlation was demonstrated between the ORP index and sperm DNA fragmentation (r = 0.24). Subgroup analysis: – r=0.23 – cumulative correlation coefficient for DNA fragmentation assessed using the SCD method – r=0.29 – cumulative correlation coefficient for DNA fragmentation assessed using other methods A moderate level of heterogeneity was observed between studies.
16	*Gill et al.* (2024)	Study group – Men with abnormal semen analysis (n = 179) with asthenozoospemią (n = 71) without asthenozoospermia (n = 108) Control group – men with normozoospermia (n =98) with proven fertility (n = 43) potentially fertile (n = 55) Normalization of sORP to sperm concentration.	ORP indices were statistically significantly higher among men with abnormal semen results and asthenozoospermia (median: 4.16 sperm/mL) compared to those with abnormal semen results without asthenozoospermia (1.23 mV/10^6 sperm/mL) and the control group (0.99 mV/10^6 sperm/mL). The highest frequency of abnormal ORP index values (>1.37 mV/10^6 sperm/mL) was noted in men with asthenozoospermia (75%) compared to the group without asthenozoospermia (47%) and the control group (35%). The frequency of abnormal sperm DNA fragmentation results (>20%) was highest in the group of men with asthenozoospermia (62%) compared to the group without asthenozoospermia (37%) and the control group (13%). The risk of an elevated ORP index (>1.37 mV/10^6 sperm/mL) was six times higher in the asthenozoospermia group compared to the control group, and more than three times higher compared to the group without asthenozoospermia. The risk of sperm DNA fragmentation >20% was 10 times higher in the asthenozoospermia group compared to the control group, and more than three times higher compared to the group without asthenozoospermia..
17	*Niu et al.* (2023)	Study Group – couples qualified for the conventional IVF procedure (n = 136) The study involved measuring ORP in the medium after gamete incubation (4 hours) during the IVF procedure (fresh embryo transfer, n =105) The group was divided into 4 subgroups based on the obtained sORP values (quartile distribution)	Range of raw ORP (mV) in culture medium: Group I (n=34) – 191.5–228.4 mV Group II (n=34) – 228.7–235.3 mV Group III (n=34) – 235.4–242.7 mV Group IV (n=34) – 242.8–295.3 mV Number of procedures (first fresh transfers) in groups: Group I (n = 23) Group II (n = 25) Group III (n = 28) Group IV (n = 29) Optimal range of sORP (mV) for IVF outcomes lies between 228.7 and 235.3 mV (Group II): – live birth rates: 32% in Group II compared to 3.6% in Group III (statistically significant) and 8.7% in Group I and 13.8% in Group IV – clinical pregnancy rates: 32% in Group II compared to 3.6% in Group III (statistically significant) and 8.7% in Group I and 13.8% in Group IV – biochemical pregnancy rates: 36.0% in Group II compared to 3.6% in Group III (statistically significant) and 13% in Group I and 17.2% in Group IV – implantation rates: 31.3% in Group II compared to 2.7% in Group III (statistically significant) and 6.7% in Group I and 11.8% in Group IV Too high and too low ORP values were associated with poorer IVF outcomes.
18	*Tan et al.* (2024,)	Meta-analysis – evaluation of the diagnostic value of the ORP index in the context of male infertility disorders – 7 publications – Total number of cases: n = 6578	Measurement of the ORP index demonstrates high sensitivity and moderate specificity as a diagnostic tool in the evaluation of male infertility: – cumulative sensitivity across all included studies: 81% – cumulative specificity across all included studies: 66% – AUC: 0.8097 – positive likelihood ratio (PLR): 2.57 – negative likelihood ratio (NLR): 0.28 A high level of heterogeneity was observed among the studies included in the analysis.

Abbreviations: AUC – area under the curve; CMA3 – chromomycin A3; COMET – comet assay; OR – odds ratio; ORP – oxidation-reduction potential; SCD – sperm chromatin dispersion test; SD – standard deviation; SEM – standard error of the mean; SDF – sperm DNA fragmentation; sORP – non-normalized (*static*) ORP TMSC – total motile sperm count; TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling.

na obecność OS w nasieniu z dużym prawdopodobieństwem odzwierciedlają rzeczywistą obecność patologii, co czyni system MiOXSYS® użytecznym narzędziem diagnostycznym w przypadku podejrzenia męskiego czynnika niepłodności.

„Metaanaliza siedmiu badań dotyczących wartości diagnostycznej ORP w niepłodności męskiej, przeprowadzona przez *Tan i wsp.* (2024), wykazała wysoką skuteczność tego parametru w wykrywaniu niepłodności związanej ze stresem oksydacyjnym, ze skumulowaną czułością na poziomie 81%. Jednak umiarkowana skumulowana swoistość (66%) sugeruje, że test może generować wyniki fałszywie dodatnie, co ogranicza jego przydatność jako samodzielnego narzędzia diagnostycznego. Mimo to test może mieć wartość jako marker uzupełniający w połączeniu z tradycyjną analizą nasienia. Ponadto wykazuje umiarkowaną zdolność do potwierdzania nieprawidłowości w nasieniu, co odzwierciedla dodatni współczynnik wiarygodności (PLR, ang. *positive likelihood ratio*) wynoszący 2,57. Wysoki wynik wskaźnika ORP zwiększa prawdopodobieństwo diagnozy niepłodności związanej ze stresem oksydacyjnym około 2,5-krotnie. Parametr ten wykazuje również umiarkowaną skuteczność w wykluczaniu zaburzeń płodności związanych ze stresem oksydacyjnym, co potwierdza ujemny współczynnik wiarygodności (NLR, ang. *negative likelihood ratio*) wynoszący 0,28. Autorzy metaanalizy podkreślają, że wyniki włączonych badań wykazują dużą heterogeniczność, wynikającą z różnic w protokołach badawczych, populacjach pacjentów oraz wartościach progowych. Niemniej jednak wskazują oni, że wskaźnik ORP stanowi cenne uzupełnienie tradycyjnej analizy nasienia, wspierając bardziej precyzyjne podejście diagnostyczne i terapeutyczne w niepłodności męskiej.

Według materiałów zamieszonych na stronie producenta (https://learning.mioxsys.com/), wartości odcięcia indeksu ORP w zakresie 1,34–1,42 mV/10^6 plemników/mL prezentują wysoką zgodność w ocenie jakości nasienia, pozwalając na rozróżnianie próbek w zależności od ich charakterystyki (prawidłowa vs. nieprawidłowa) oraz statusu płodności mężczyzny (płodny vs. niepłodny) wskazując na ich przydatność w diagnostyce zaburzeń męskiej płodności:

- 1,34 mV/10^6 plemników/mL – wartość odcięcia skutecznie różnicująca mężczyzn z nieprawidłowym wynikiem badania. Jej PPV wynosi aż 94,7%, co świadczy o wysokiej wiarygodności w identyfikacji zaburzeń w jakości nasienia (*Agarwal i wsp.*, 2019a).
- 1,36 mV/10^6 plemników/mL – wartość umożliwiająca rozróżnienie mężczyzn z prawidłowym i nieprawidłowym wynikiem badania nasienia. PPV wynosi tutaj 85,3%, co wskazuje na skuteczność w wykrywaniu różnic w jakości próbek (*Agarwal i wsp.*, 2017c).
- 1,38 mV/10^6 plemników/mL – ta wartość pozwala dokładniej zróżnicować mężczyzn z nieprawidłowym wynikiem nasienia od tych z normozoospermią, osiągając PPV na poziomie 98%, co czyni ją jedną z najbardziej precyzyjnych wartości w tym zakresie (*Arafa i wsp.*, 2018).

with a cumulative sensitivity of 81%. However, its moderate cumulative specificity (66%) suggests that the test may generate false-positive results, limiting its standalone diagnostic utility. Nevertheless, the test may have value as a supplementary marker when combined with traditional semen analysis. Additionally, it appears to have a moderate ability to confirm problems in semen, indicated by a positive likelihood ratio (PLR) of 2.57. A high ORP index result increases the likelihood of diagnosing OS-related infertility by approximately 2.5 times. It also demonstrates moderate effectiveness in ruling out OS-related fertility disorders, with a negative likelihood ratio (NLR) of 0.28. The authors of the meta-analysis emphasize that the results exhibit high heterogeneity, stemming from differences in study protocols, patient populations, and cut-off values. Nevertheless, they conclude that the ORP index is a valuable complement to traditional semen analysis, supporting a more precise therapeutic and diagnostic approach to male infertility.

Various ORP index cut-off values for evaluating semen quality, ranging from 1.34 to 1.42 mV/10^6 sperm/mL. are provided on the manufacturer's website (https://learning.mioxsys.com/). They appear to demonstrate high consistency in differentiating samples based on their characteristics (normal vs. abnormal) and the fertility status of men (fertile vs. infertile). They may hence play a significant role in diagnosing male infertility:

- 1.34 mV/10^6 sperm/mL – this cut-off value effectively differentiates men with abnormal semen results, with a positive predictive value (PPV) of 94.7%, indicating high reliability in identifying semen quality impairments (*Agarwal et al.*, 2019a).
- 1.36 mV/10^6 sperm/mL – this value distinguishes men with normal and abnormal semen analysis results, with a PPV of 85.3%, demonstrating its effectiveness in detecting differences in sample quality (*Agarwal et al.*, 2017c).
- 1.38 mV/10^6 sperm/mL – this cut-off allows for more precise differentiation between men with abnormal semen and those with normozoospermia, achieving a PPV of 98%, making it one of the most accurate values in this range (Arafa et al., 2018).
- 1.41 mV/10^6 sperm/mL – this threshold differentiates semen samples from fertile men and those from men with fertility disorders, with a PPV of 95%, confirming its effectiveness in assessing fertility potential (Arafa et al., 2018).
- 1.42 mV/10^6 sperm/mL – the highest threshold in this range identifies infertile men (male factor infertility) compared to healthy donors, with a PPV of 93.3%, underscoring its value in differential fertility diagnosis (*Agarwal et al.*, 2017a).

The small differences in the cut-off values presented above may result from variations in research

- 1,41 mV/10^6 plemników/mL – wartość progowa, która umożliwia odróżnienie próbek nasienia uzyskanych od mężczyzn płodnych od próbek nasienia uzyskanych od mężczyzn z zaburzeniami płodności. PPV na poziomie 95% potwierdza jej skuteczność w ocenie potencjału płodności (*Arafa i wsp.*, 2018).
- 1,42 mV/10^6 plemników/mL – najwyższa wartość progowa w tym zakresie pozwala na odróżnienie mężczyzn z niepłodnością (czynnik męski zaburzeń płodności pary) od zdrowych dawców. PPV wynosi tutaj 93,3%, co podkreśla jej przydatność w różnicowej diagnostyce płodności (*Agarwal i wsp.*, 2017a).

Niewielkie różnice w przedstawionych powyżej wartościach progowych mogą wynikać z odmiennych protokołów badawczych, kryteriów włączenia i wyłączenia uczestników oraz punktów końcowych stosowanych w badaniach. Także w innych badaniach ustalono podobne wartości, różnicujące mężczyzn płodnych od niepłodnych lub z prawidłowymi i nieprawidłowymi wynikami nasienia: 1,40 mV/10^6 plemników/mL (czułość 77,4%, swoistość 85,0%) (*Gill i wsp.*, 2022), 1,48 mV/10^6 plemników/mL (czułość 60,0%, swoistość 75,0%) (*Agarwal i wsp.*, 2016), 1,40 mV/10^6 plemników/mL (czułość 76,4%, swoistość 75,9%) (*Homa i wsp.*, 2019).

Warto zauważyć, że podane powyżej wartości odcięcia mieszą się w zakresie fizjologicznych wartości indeksu ORP, ustalonych doświadczalnie w badaniach *in vitro* z zastosowaniem induktora OS – kumenu hydronadtlenku i RS – kwasu askorbinowego (*Panner Selvam i wsp.*, 2020). We wspomnianym badaniu indeks ORP wynoszący od -9,76 do 1,48 mV/10^6 plemników/mL, okazał się niezbędny dla utrzymania prawidłowych parametrów nasienia (t.j. ruchliwość czy żywotność). Próbki nasienia, w których wartość ORP wynosiła ≤-9,76 mV/10^6 plemników/mL lub ≥1,48 mV/10^6 plemników/mL, były klasyfikowane jako patologiczne w wyniku wywołania *in vitro* OS lub RS za pomocą w/w induktorów. Choć oba rodzaje stresu mają podobny wpływ na parametry nasienia to wymagają odmiennych podejść terapeutycznych, co podkreśla znaczenie ich precyzyjnej diagnozy. Dodatkowo w badaniu tym wykazano, że zarówno OS, jak i RS negatywnie wpływają na mitochondria, zmniejszając ekspresję białek uczestniczących w fosforylacji oksydacyjnej (synteza ATP) odbywającej się na poziomie łańcucha oddechowego (OXPHOS, ang. *oxidative phosphorylation at the level of respiratory chain*). Stwierdzono spadek ekspresji białek takich jak: UQCRC2 (podjednostka 2 kompleksu cytochromu b-c1[1], ang. *cytochrome b-c1 complex subunit 2*), MTCO1 (podjednostka I oksydazy cytochromu c[2], ang. *mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I*) i ATPA (podjednostka α syntazy ATP[3], ang. *ATP synthase subunit α*). Obniżona aktywność tych białek

1 Kompleks b-c1 stanowi kompleks III łańcucha oddechowego (przyp. red.)
2 Oksydaza cytochromowa – oksydaza cytochromu c stanowi kompleks IV łańcucha oddechowego (przyp. red.)
3 Syntaza ATP katalizuje fosforylację ADP do ATP i stanowi kompleks V łańcucha oddechowego (przyp. red.)

protocols, inclusion and exclusion criteria, and study endpoints. Similar cut-off values were established in other studies differentiating fertile and infertile men or samples with normal and abnormal semen results: 1.40 mV/10^6 sperm/mL (sensitivity 77.4%, specificity 85.0%) (*Gill et al.*, 2022), 1.48 mV/10^6 sperm/mL (sensitivity 60.0%, specificity 75.0%) (*Agarwal et al.*, 2016), 1.40 mV/10^6 sperm/mL (sensitivity 76.4%, specificity 75.9%) (*Homa et al.*, 2019).

It is worth noting that the above cut-off values fall within the range of physiological ORP index values determined *in vitro* using cumene hydroperoxide as an OS inducer and ascorbic acid as an RS inducer (*Panner Selvam et al.*, 2020). The findings indicated that an ORP index between -9.76 and 1.48 mV/10^6 sperm/mL was necessary to maintain normal semen parameters (e.g., motility and viability): the semen samples with ORP values ≤-9.76 mV/10^6 sperm/mL or ≥1.48 mV/10^6 sperm/mL were classified as pathological. Although both types of stress have similar effects on semen parameters, they require distinct therapeutic approaches, emphasizing the importance of precise diagnosis. Additionally, the findings demonstrated that both OS and RS negatively impact mitochondria, reducing the expression of proteins involved in oxidative phosphorylation (ATP synthesis) at the level of the respiratory chain (OXPHOS). A decrease in the expression of various proteins, such as UQCRC2 (cytochrome b-c1 complex subunit 2), MTCO1 (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase subunit I), and ATPA (ATP synthase subunit α) was observed. Their inhibition led to a decline in mitochondrial membrane potential (MMP) and ATP synthesis, which are essential for sperm motility and the fertilization process.

Studies on the relationship between the ORP index and sperm DNA fragmentation (SDF) indicate an association between these parameters. *Majzoub et al.* (2018) report significantly higher ORP and SDF levels in infertile men compared to fertile men, and a significant positive correlation was found between the two parameters among infertile men (r = 0.222). Additionally, both parameters were negatively correlated with the percentage of sperm with normal morphology, and positively with sperm head defects. Similar findings were reported by *Gill et al.* (2022) and *Arafa et al.* (2020), who confirmed a positive correlation between SDF and the ORP index (r = 0.385 and r = 0.218, respectively). Notably, these studies also observed correlations with non-normalized ORP, which is less frequently analyzed (r = 0.266 and r = 0.181, respectively). Furthermore, *Elbardisi et al.* (2020) and *Arafa et al.* (2020) demonstrated that the strength of the correlation between the ORP index and SDF increased when ORP was normalized to the number of motile sperm (motORP: mV/10^6 motile sperm/mL), suggesting that this parameter

prowadziła do spadku potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (MMP, ang. *mitochondrial membrane potential*) i syntezy ATP, kluczowych dla ruchliwości plemników i procesu zapłodnienia.

Badania dotyczące związku między wskaźnikiem ORP a fragmentacją DNA plemników (SDF, ang. *sperm DNA fragmentation*) wskazują na istnienie zależności między tymi parametrami. *Majzoub i wsp.* (2018) wykazali istotnie wyższy wskaźnik ORP i SDF u mężczyzn niepłodnych w porównaniu do płodnych. W grupie niepłodnych mężczyzn zaobserwowano istotną dodatnią korelację między obu parametrami (r = 0,222). Dodatkowo, oba badane parametry, wykazywały odwrotną korelację z odsetkiem plemników o prawidłowej morfologii oraz dodatnią korelację z defektami główki plemnika. Podobne wyniki uzyskano w badaniach *Gill i wsp.* (2022) oraz *Arafa i wsp.* (2020), gdzie potwierdzono dodatnią korelację między SDF i wskaźnikiem ORP (odpowiednio, r = 0,385 i r = 0.218), a także, co warto podkreślić, z nieznormalizowanym ORP, który jest rzadko poddawany analizie (odpowiednio, r = 0,266 i r = 0,181). Co więcej, *Elbardisi i wsp.* (2020) oraz *Arafa i wsp.* (2020) zaobserwowali, że siła korelacji między wskaźnikiem ORP a SDF wzrasta, gdy wskaźnik ORP jest normalizowany względem liczby ruchliwych plemników (motORP: mV/10^6 ruchliwych plemników/mL), co sugeruje, że parametr ten lepiej odzwierciedla OS w kontekście czynności plemników (r = 0,218 vs r = 0,387). We wszystkich powyższych badaniach SDF było oceniane metodą dyspersji chromatyny plemnika (ang. *sperm chromatin dispersion assay*).

W badaniach *Henkel i wsp.* (2022) wskaźnik ORP silnie korelował z SDF ocenianym metodą TUNEL (znakowanie końców nacięć nici DNA przy użyciu terminalnej transferazy deoksynukleotydowe, ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end lab eling*) w grupie mężczyzn z niepłodnych par zakwalifikowanych do leczenia metodami wspomaganego rozrodu (r = 0,665). Dodatnią korelację między wskaźnikiem ORP a SDF obserwowano również w grupach mężczyzn z niewyjaśnioną niepłodnością (*Rasmussen i wsp.*, 2024) (r = 0,51), z żylakami powrózków nasiennych (*Tanaka i wsp.*, 2022) (r = 0,320) czy też w niewyselekcjonowanych grupach mężczyzn (*Gill i wsp.*, 2021; *Gill i wsp.*, 2024) (odpowiednio, r = 0,364 i r = 0,289). Istotny związek między wskaźnikiem ORP oraz poziomem RFT (metoda chemiluminescencyjna), a SDF (metoda SCSA [ang. *Sperm Chromatin Structure Assay*]), wykazano w badaniach *Homa i wsp.* (2019). W grupie z OS, ocenionym zarówno metodą chemiluminescencji, jak i za pomocą systemu MiOXSYS®, fragmentacja DNA była znacząco wyższa w porównaniu do grup z równowagą oksydacyjno–redukcyjną. Korelacja między poziomem RFT a SDF była umiarkowana, lecz istotna statystycznie (r = 0,243), podczas gdy związek między ORP a SDF nie osiągnął poziomu istotności w tej populacji, prawdopodobnie ze względu mała liczbę przypadków (n = 47, r = 0,240). Autorzy wskazują, że oba parametry dostarczają cennych, uzupełniających się informacji better reflects OS in the context of sperm function (r = 0.218 vs r = 0.387). In all the above studies, SDF was assessed using the sperm chromatin dispersion (SCD) assay.

Henkel et al. (2022) found the ORP index to strongly correlate with SDF assessed using the TUNEL method (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) in a group of men from infertile couples undergoing assisted reproductive treatment (r = 0.665). Elsewhere, a positive correlation between ORP and SDF was noted in a group of men with unexplained infertility (*Rasmussen et al.*, 2024) (r = 0.51), varicocele (*Tanaka et al.*, 2022) (r = 0.320) as well as unselected group of infertile men (*Gill et al.*, 2021; *Gill et al.*, 2024) (r = 0.364 and r = 0.289, respectively). A significant association between ORP, reactive oxygen species (ROS) levels (measured using chemiluminescence), and SDF (assessed by sperm chromatin structure assay, SCSA) was demonstrated by *Homa et al.* (2019). An analysis based on chemiluminescence and the MiOXSYS® system identified significantly higher DNA fragmentation in a group with OS compared to a group with balanced oxidative-reductive potential. The correlation between ROS levels and SDF was moderate but statistically significant (r = 0.243), while the association between ORP and SDF was not significant, likely due to the small sample size (n = 47, r = 0.240). The authors noted that both parameters provide valuable complementary diagnostic information and could be used together for a more accurate evaluation of OS and its impact on sperm DNA integrity. An additional insight into the relationship between ORP, SDF (TUNEL method and COMET assay), and chromatin condensation was provided by *Garcia-Segura et al.* (2020). This study found no significant correlation between ORP and sperm DNA fragmentation. However, a significant negative correlation was observed between ORP and the percentage of sperm with abnormal chromatin condensation; the chromatin was assessed using chromomycin A3 (CMA3), which evaluates protamination abnormalities. The authors emphasize the complexity of interactions between OS and sperm DNA integrity, and highlight the need for a comprehensive diagnostic approach incorporating ORP, SDF, and chromatin condensation.

While most studies have noted relationships between ORP and SDF, the strength of the correlation varies, which may be influenced by the analysis methods and study population. Higher ORP values, a marker of OS in semen, are generally associated with higher SDF levels, confirming the critical role of ROS in sperm DNA damage (*Majzoub et al.*, 2018; *Gill et al.*, 2022; *Arafa et al.*, 2020; *Henkel et al.*, 2022; *Rasmussen et al.*, 2024).

diagnostycznych i mogą być stosowane razem w celu dokładniejszej oceny OS oraz jego wpływu na integralność DNA plemników. Z kolei badanie *Garcia-Segura i wsp.* (2020) dostarcza istotnych informacji na temat związku między wskaźnikiem ORP, SDF (metoda TUNEL i COMET [test kometowy, ang. *comet assay*]) oraz kondensacją chromatyny weryfikowaną testem z chromomycyną A3 (CMA3, ang. *chromomycin A3*), który wykorzystywany jest do oceny zaburzeń w jej protaminacji. W badaniu tym wykazano brak istotnej korelacji między ORP a poziomem fragmentacji DNA plemników, jednocześnie zaobserwowano istotną negatywną korelację między ORP a odsetkiem plemników z nieprawidłową kondensacją chromatyny. Autorzy podkreślają złożoność interakcji między OS a integralnością DNA plemników, wskazując na potrzebę bardziej złożonej diagnostyki uwzględniającej ORP, SDF i kondensację chromatyny.

Pomimo spójnych obserwacji dotyczących związku między ORP a SDF w większości badań, istnieją różnice w sile korelacji w zależności od zastosowanych metod analizy i badanej populacji. Wyższe wartości wskaźnika ORP, będące markerem OS w nasieniu, są ogólnie związane z wyższymi poziomami SDF, co potwierdza kluczową rolę RFT w uszkodzeniach DNA plemników (*Majzoub i wsp.*, 2018; *Gill i wsp.*, 2022; *Arafa i wsp.*, 2020; *Henkel i wsp.*, 2022; *Rasmussen i wsp.*, 2024).

W jedynej jak do tej pory metaanalizie badającej związek między indeksem ORP a fragmentacją DNA plemników, potwierdzona została korelacja między wysokimi wartościami indeksu ORP a zwiększonym poziomem SDF (*Panner Selvam i wsp.*, 2022). Na podstawie wyników siedmiu publikacji wykazano, że wyższe wartości indeksu ORP odzwierciedlają większe obciążenie OS, który negatywnie wpływa na jakość nasienia, prowadząc do uszkodzeń DNA plemników (skumulowany r = 0,24). Warto podkreślić, że większość uwzględnionych badań charakteryzowała się dobrą jakością według zmodyfikowanej skali Newcastle-Ottawa, umiarkowanym stopniem heterogeniczności oraz brakiem stronniczości publikacyjnej. Autorzy metaanlizy wskazują także na potencjał zastosowania sytemu MiOXSYS® w monitorowaniu skuteczności terapii antyoksydacyjnej oraz kwalifikacji pacjentów do procedur wspomaganego rozrodu, podkreślając jednocześnie konieczność standaryzacji wartości odcięcia w celu szerszego wykorzystania tego wskaźnika w praktyce klinicznej.

System MiOXSYS® może być wykorzystywany także do analizy ORP np. w mediach stosowanych w procedurach wspomaganego rozrodu, gdzie mimo znanego składu chemicznego brak jest danych o ich stanie redoks. W badaniu *Panner Selvam i wsp.* (2018) dokonano pomiaru 10 różnych mediów, wykorzystywanych zarówno do płukania plemników, ich zamrażania jak i do hodowli oocytów i zarodków. Badanie to podkreśla potrzebę monitorowania i dostosowywania wartości sORP w mediach wykorzystywanych przy procedurach ART, aby poprawić jakość plemników i zarodków oraz zwiększyć skuteczność procedur zapłodnienia pozaustrojowego (IVF, ang.

In the only meta-analysis to date investigating the relationship between the ORP index and sperm DNA fragmentation, *Panner Selvam et al.* (2022) confirmed a correlation between high ORP values and increased SDF. Based on data from seven studies, higher ORP values were shown to reflect greater OS burden, negatively affecting semen quality and leading to sperm DNA damage (cumulative r = 0.24). It is noteworthy that most studies included in the meta-analysis were of good quality according to the modified Newcastle-Ottawa scale. They also showed moderate heterogeneity and lacked publication bias. The authors highlight the potential of the MiOXSYS® system for monitoring the effectiveness of antioxidant therapy and for selecting patients for assisted reproductive procedures. They also emphasize the need to standardize cut-off values to broaden the clinical applications of ORP.

The MiOXSYS® system can also be used to analyze ORP in media used during assisted reproductive technology (ART) procedures; such materials may have a known chemical composition but their redox state may be unclear. A study by *Panner Selvam et al.* (2018) performed ORP measurements on 10 different media used for sperm washing, freezing, and oocyte and embryo culture. The findings highlight the need to monitor and optimize sORP values in media used during ART to improve sperm and embryo quality and increase the success rates of in vitro fertilization (IVF). The authors propose that the MiOXSYS® system could serve as an effective tool for precise ORP assessment during ART procedures.

Niu et al. (2023) report an optimal sORP range of 228.7–235.3 mV in media after four hours of gamete incubation during IVF procedures; the analysis included implantation rate, biochemical pregnancy, clinical pregnancy, and live birth rate as outcomes. Both lower and higher ORP values were associated with poorer outcomes in the IVF procedure.

Unfortunately, the number of studies investigating the utility of the MiOXSYS® system and the ORP index in predicting ART outcomes remains limited. One of the first studies, involving 50 couples with idiopathic infertility, found that a semen ORP index of <1.57 mV/10^6 sperm/mL was associated with a higher fertilization rate, while an ORP of <0.75 mV/10^6 sperm/mL correlated with a greater likelihood of clinical pregnancy during ART procedures (*Sallam et al.*, 2021). Another study, conducted on a cohort of 144 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI), found the ORP index in semen to be significantly associated with key ART outcomes such as fertilization, blastocyst development, implantation, clinical pregnancy, and live birth (*Henkel et al.*, 2022). An ORP value below 0.51 mV/10^6 sperm/mL was linked to improved treatment outcomes with ICSI. This study accounted for a broad

in vitro fertilization). Jak podkreślają autorzy, system MiOXSYS® może zatem stanowić skuteczne narzędzie do precyzyjnej oceny sORP przy procedurach ART. *Niu i wsp.* (2023) przedstawili optymalny zakres sORP, wynoszący 228,7–235,3 mV w medium po czterech godzinach inkubacji gamet podczas procedur IVF. Analiza uwzględniała wskaźnik implantacji, ciążę biochemiczną, ciążę kliniczną oraz wskaźnik urodzeń żywych. Zarówno niższe, jak i wyższe wartości sORP były związane z gorszymi wynikami procedury IVF.

Niestety, liczba badań analizujących przydatność systemu MiOXSYS® i wskaźnika ORP w prognozowaniu wyników ART jest ograniczona. W jednym z pierwszych badań, obejmującym 50 par z niepłodnością idiopatyczną, wykazano, że wskaźnik ORP w nasieniu partnera <1,57 mV/10^6 plemników/mL był związany z wyższym wskaźnikiem zapłodnienia, natomiast ORP <0,75 mV/10^6 plemników/mL korelował z większym prawdopodobieństwem ciąży klinicznej w procedurach ART (*Sallam i wsp.*, 2021). Kolejne badanie, przeprowadzone na grupie 144 par poddanych procedurze docytoplazmatycznej iniekcji plemnika do komórki jajowej (ICSI, ang. *intracytoplasmic sperm injection*), wykazało, że wskaźnik ORP w nasieniu partnera był istotnie związany z kluczowymi wynikami ART, takimi jak zapłodnienie, rozwój blastocysty, implantacja, ciąża kliniczna i poród żywego dziecka (*Henkel i wsp.*, 2022). Wartość ORP poniżej 0,51 mV/10^6 plemników/mL, wyznaczona w badaniu, była powiązana z lepszymi wynikami leczenia z wykorzystaniem metody ICSI. W badaniu tym zastosowano krokową regresję logistyczną, uwzględniając szerokie spektrum zmiennych zakłócających, takich jak wiek partnerki, przyczyny niepłodności oraz parametry nasienia. Podejście to zwiększyło wiarygodność wyników i podkreśliło niezależną wartość predykcyjną wskaźnika ORP (*Henkel i wsp.*, 2022). Przeciwstawne wyniki uzyskali *Tomita i wsp.* (2023). W badaniu obejmującym 430 par poddanych procedurom ART (ICSI i IVF) nie stwierdzono istotnych zależności między wskaźnikiem ORP a wynikami embriologicznymi i klinicznymi, takimi jak wskaźnik zapłodnienia, rozwój zarodków, ciąża kliniczna, poród żywego dziecka czy poronienie. Zastosowano wartości odcięcia (1,38 i 1,41 mV/10^6 plemników/mL) oparte na wcześniejszych badaniach. *Tomita i wsp.* (2023) zastosowali również analizę regresji logistycznej, jednak uwzględnili tylko wiek kobiety i mężczyzny jako czynniki zakłócające, pominęli natomiast inne zmienne, takie jak parametry nasienia. Co zaskakujące, wyższe wartości wskaźnika ORP były związane z większym odsetkiem zarodków odpowiedniej jakości, nadających się do przeniesienia (transferu) do macicy w ramach wykonywanej procedury. Jednak autorzy tego badania podkreślili, że brak mechanizmu biologicznego wyjaśniającego tę zależność oraz brak spójnych korelacji z innymi wynikami ART ogranicza znaczenie tej obserwacji. Tak więc, w przeciwieństwie do wyników *Henkel i wsp.* (2022), dane tego badania sugerują, że choć ORP może mieć związek z niektórymi spectrum of confounding variables, such as partner's age, causes of infertility and semen parameters, using stepwise logistic regression. The findings emphasize the independent predictive value of the ORP index (*Henkel et al.*, 2022). Contrasting findings were reported by *Tomita et al.* (2023). In a study of 430 couples undergoing ART (ICSI and IVF), no significant associations were found between the ORP index and embryological or clinical outcomes, including fertilization rate, embryo development, clinical pregnancy, live birth, or miscarriage. Cut-off values (1.38 and 1.41 mV/10^6 sperm/mL) from previous studies were used. Although *Tomita et al.* (2023) also applied logistic regression, the analysis included only the age of the woman and the man as confounding factors, while omitting other variables such as semen parameters. Interestingly, higher ORP index values were associated with a higher proportion of good-quality embryos suitable for transfer. However, the authors emphasized the lack of a biological mechanism explaining this relationship and the absence of consistent correlations with other ART outcomes, limiting the significance of this observation. Thus, in contrast to *Henkel et al.* (2022), their results suggest that while ORP may be related to certain embryological parameters, it does not demonstrate independent predictive value for ART outcomes such as clinical pregnancy or live birth. Further studies are therefore necessary to verify these observations, which should include various ART procedures (intrauterine insemination – IUI, ICSI, IVF) and explore potential biological mechanisms. It is also crucial to expand the range of included confounding variables to better assess the potential role of ORP in personalizing infertility treatment.

parametrami embriologicznymi, to nie wykazuje niezależnej wartości predykcyjnej w odniesieniu do wyników ART, takich jak ciąża kliniczna, czy poród żywego dziecka. W związku z powyższym konieczne są dalsze badania weryfikujące te obserwacje, które powinny uwzględniać różne procedury ART (inseminacja domaciczna – IUI, ang. *intrauterine insemination*, ICSI, IVF) oraz analizę potencjalnych mechanizmów biologicznych. Kluczowe będzie także rozszerzenie zakresu uwzględnionych zmiennych zakłócających, aby dokładniej ocenić potencjalną rolę ORP w personalizacji leczenia niepłodności.

Kontrowersje związane z pomiarem stresu oksydacyjnego z wykorzystaniem systemu MiOXSYS®
Controversies Related to Oxidative Stress Measurement Using the MiOXSYS® System

Nie ulega wątpliwości, że system MiOXSYS®, jest szybkim i prostym w użyciu narzędziem diagnostycznym o dużym potencjale klinicznym. Jego innowacyjność oraz przydatność zostały potwierdzone w licznych badaniach. Niemniej jednak, system ten budzi pewne wątpliwości związane z aspektami metodologicznymi oraz interpretacją uzyskiwanych wyników, co wskazuje na potrzebę dalszych badań i dopracowania standardów jego zastosowania (*Joao i wsp.*, 2022; *Castleton i wsp.*, 2022; *Aitken* i *Gharagozloo*, 2024).

Po pierwsze, sugeruje się, że system mierzy bezpośrednio ORP środowiska w jakim zawieszone są plemniki, czyli plazmy nasienia, a nie samych plemników (*Joao i wsp.*, 2022). Z klinicznego punktu widzenia istotna byłoby ocena ORP także samych plemników, ponieważ to plemniki (pozbawione plazmy nasienia) biorą udział w zapłodnieniu komórki jajowej . Dodatkowo sugeruje się, że gamety męskie mogą mieć ograniczony wpływ na wartość sORP w nasieniu, co rodzi pytanie dotyczące zasadności stosowania normalizacji sORP względem koncentracji plemników. Z jednej strony badacze ci wykazali, że wartości sORP w nasieniu i w samej plazmie nasienia (po usunięciu z niej plemników) były do siebie zbliżone. Z drugiej strony, w 10 z 57 analizowanych próbek zaobserwowano jednak znaczny spadek wartości sORP (od 30% do 96%) po usunięciu plemników, co dotyczyło głównie próbek z wysoką koncentracją. Może to sugerować, że wpływ plemników na wartość sORP jest bardziej zauważalny przy ich wyższej koncentracji, podczas gdy przy niższej, może on prawdopodobnie odzwierciedlać głównie ORP plazmy nasienia. Informacje o statusie redoks plazmy są cenne dla analizy środowiska, w którym znalazły się plemniki w czasie ejakulacji. Stąd też konieczne są dalsze badania, aby dokładniej określić związek między OS w plazmie nasienia i w plemnikach.

Interesujące wyniki uzyskano w badaniach *in vitro*, w których wywoływano OS w plemnikach ludzkich przy użyciu czynników wyzwalających wewnątrzkomórkową produkcję RFT (*Ballo i wsp.*, 2023). Wykazano w nich jednoznacznie, że wartość sORP (mV) wzrastała w sposób zależny od stężenia zastosowanego czynnika.

There is no doubt that the MiOXSYS® system is a fast and user-friendly diagnostic tool with significant clinical potential. Its innovation and utility have been confirmed in numerous studies. However, the system raises certain methodological and interpretative concerns, underscoring the need for further research and the refinement of application standards (*Joao et al.*, 2022; *Castleton et al.*, 2022; *Aitken* and *Gharagozloo*, 2024).

Firstly, it has been suggested that the MiOXSYS® system measures the ORP of the environment in which sperm are suspended, i.e., seminal plasma, rather than the sperm themselves (*Joao et al.*, 2022). From a clinical perspective, it would be desirable to evaluate the ORP of the sperm themselves, devoid of seminal plasma, as they are directly involved in oocyte fertilization. Moreover, it has been suggested that sperm may have a limited influence on the sORP value of semen, raising questions about the validity of normalizing sORP values to sperm concentration. While similar sORP values have been recorded in semen and seminal plasma, i.e., after sperm removal, 10 out of 57 analyzed samples demonstrated a significant decrease in sORP (30% to 96%) after sperm removal, primarily in samples with high sperm concentrations. This suggests that while higher concentrations of sperm may noticeably influence sORP, at lower sperm concentrations, the ORP value may primarily reflect the redox status of seminal plasma. Information on the redox status of seminal plasma is valuable for understanding the environment surrounding sperm at ejaculation. Therefore, further studies are necessary to better define the relationship between OS in seminal plasma and sperm.

Interesting results were obtained by *in vitro* studies where OS was induced in human sperm using ROS-inducing agents. It was found that the sORP value (mV) increased in a concentration-dependent manner with the applied agent. Also, as the sORP value rose in response to induced OS, both sperm viability

Równocześnie, wraz ze wzrostem sORP, w odpowiedzi na wywołany OS, zarówno żywotność jak i ruchliwość plemników ulegała pogorszeniu. Co więcej, ten negatywny efekt ulegał istotnemu wzmocnieniu, kiedy plemniki zostały pozbawione plazmy nasienia, co potwierdza jej aktywność antyoksydacyjną i tym samym ochronny wpływ na plemniki (*Ballo i wsp.*, 2023). Niestety, w badaniach *in vivo,* jak do tej pory w pojedynczych przypadkach, oprócz wartości wskaźnika, prezentowane są także wyniki nieznormalizowanego ORP w analizach porównawczych badanych grup mężczyzn różniących się statusem płodności lub jakością nasienia. W jednym z takich badań udało się zaobserwować różnice w wynikach nie tylko wskaźnika, ale także nieznormalizowanego ORP między mężczyznami płodnymi i niepłodnymi (*Gill i wsp.*, 2022). Z kolei w innym badaniu, gdzie porównywano mężczyzn z prawidłowymi i nieprawidłowymi parametrami nasienia, takie różnice nie były zauważalne. Jednak, gdy dodatkowo dokonano podziału mężczyzn z nieprawidłowymi parametrami nasienia według poszczególnych typów zaburzeń, statystycznie znamienne różnice w wynikach sORP pojawiły się między mężczyznami z normozoospermią a astenozoospermią (*Joao i wsp.*, 2022). Obserwacje te wskazują, że prosty podział badanych na mężczyzn z normozoospemią i nieprawidłowymi parametrami nasienia może być niewystarczający, aby zaobserwować różnice w sORP, ponieważ grupa mężczyzn z nieprawidłowymi wynikami badania nasienia nadal może być heterogenna pod względem występowania OS.

Ponadto, niektórzy badacze zwracają uwagę na pewne ograniczenia systemu MiOXSYS® w kontekście stosowanej normalizacji sORP względem koncentracji plemników, co może utrudniać interpretację wyników, szczególnie w przypadku próbek o niskiej (<5–10 mln/mL) oraz wysokiej (>50 mln/mL) koncentracji męskich gamet (*Joao i wsp.*, 2022; *Ballo i wsp.*, 2023). Normalizacja sORP dla próbek z koncentracją plemników poniżej określonego progu (5–10 mln/mL) prowadzi do uzyskania wskaźnika ORP powyżej wartości referencyjnej wskazującej na OS. Podczas gdy w przypadku próbek o koncentracji plemników przekraczającej 50 mln/mL, wskaźnik ORP zwykle pozostaje poniżej wartości referencyjnej. Tak więc, jak sugerują autorzy, przyjęta metoda normalizacji może prowadzić do uproszczonej klasyfikacji próbek: próbki o niskiej koncentracji będą uznawane za te, w których występuje OS, a próbki o wysokiej koncentracji jako wolne od OS. Nie ulega wątpliwości, że stres oksydacyjny w nasieniu/plemnikach wiąże się z pogorszeniem poszczególnych parametrów nasienia, w tym liczby plemników (*Aitken* i *Gibb*, 2022; *Sengupta i wsp.*, 2024; *Agarwal i wsp.*, 2014; *Tvrda i wsp.*, 2011). Niemniej jednak, istnieją opinie, że stosowanie normalizacji sORP względem koncentracji plemników, w niektórych przypadkach może maskować rzeczywisty obraz stanu oksydacyjno–redukcyjnego nasienia, co wymaga dalszej weryfikacji i dopracowania metod interpretacji wyników (*Joao i wsp.*, 2022; *Castleton i wsp.*, 2022; *Aitken* i *Gharagozloo*, 2024).

and motility deteriorated. Moreover, this negative effect was significantly amplified when sperm were deprived of seminal plasma, underscoring the antioxidant and protective role of seminal plasma (*Ballo et al.*, 2023). Unfortunately, few *in vivo* studies comparing groups of men differing in fertility status or semen quality have presented non-normalized ORP values alongside index values. However, in one such study, differences were observed between fertile and infertile men in both the index values and the non-normalized ORP (*Gill et al.*, 2022). In contrast, in another study, no such differences were found between men with normal and abnormal semen parameters; however, when the abnormal semen parameter group was further subdivided by specific types of abnormalities, significant differences in sORP results were found between men with normozoospermia and those with asthenozoospermia (*Joao et al.*, 2022). These observations suggest that a simple division of subjects based on the presence of abnormalities also may be insufficient to detect differences in sORP, as the group with abnormal semen parameters may still be heterogeneous with respect to the presence of OS.

Moreover, some researchers have highlighted limitations related to the normalization of sORP values to sperm concentration as this may complicate result interpretation, particularly for samples with low (<5–10 million/mL) or high (>50 million/mL) concentrations of male gametes (*Joao et al.*, 2022; *Ballo et al.*, 2023). For samples with sperm concentrations below a specific threshold (5–10 million/mL), sORP normalization yields an ORP index exceeding the reference value indicative of OS; in contrast, for samples with sperm concentrations exceeding 50 million/mL, the ORP index usually remains below the reference value. Therefore, as the authors suggest, the adopted normalization method may lead to a simplified classification of samples: low-concentration samples will be classified as exhibiting OS, while high-concentration samples will be classified as OS-free. Undoubtedly, oxidative stress in semen/sperm is associated with a deterioration of various semen parameters, including sperm count (*Aitken* and *Gibb*, 2022; *Sengupta et al.*, 2024; *Agarwal et al.*, 2014; *Tvrda et al.*, 2011). Nevertheless, it has been proposed that normalizing sORP relative to sperm concentration may, in some cases, obscure the true redox state of semen, necessitating further verification, and refinement, of result interpretation methods (*Joao et al.*, 2022; *Castleton et al.*, 2022; *Aitken* and *Gharagozloo*, 2024). Additionally, sORP normalization may present challenges in studies evaluating the effects of treatment (e.g., antioxidant therapy or varicocelectomy) on semen quality and presence of OS. This is because an increase in sperm count following intervention automatically leads to a reduction in ORP index,

Dodatkowo, w badaniach, w których ocenia się wpływ zastosowanego leczenia na jakość nasienia i obecność stresu oksydacyjnego (np. leczenie antyoksydantami czy operacja żylaków powrózka nasiennego), normalizacja sORP może stanowić wyzwanie przy interpretacji wyników, gdyż sam wzrost liczby plemników po interwencji prowadzi automatycznie do zmniejszenia wartości wskaźnika ORP, niezależnie od faktycznych zmian w potencjale oksydacyjno–redukcyjnym (*Kavoussi i wsp.*, 2022; *Arafa i wsp.*, 2020). W związku z tym, niektórzy badacze podnoszą pytanie, czy ocena „surowych"/nieznormalizowanych wartości ORP nie zapewniłaby dokładniejszego odzwierciedlenia faktycznego stanu oksydacyjno–redukcyjnego nasienia.

Kolejnym aspektem wymagającym uwagi w kontekście normalizacji wyniku ORP względem koncentracji plemników jest analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem ORP a parametrami nasienia. Na przykład negatywna korelacja pomiędzy wskaźnikiem ORP a koncentracją plemników może częściowo wynikać z matematycznych zależności, a niekoniecznie odzwierciedlać bezpośrednie związki biologiczne Podobnie, niezależne korelacje między koncentracją plemników a ich całkowitą liczbą, ruchliwością czy morfologią, jak również fragmentacją DNA, mogą wpływać na wyniki analiz korelacji pomiędzy wskaźnikiem ORP a innymi parametrami nasienia. Taka sytuacja rodzi ryzyko nadinterpretacji wyników korelacji, które mogą w pewnym stopniu odzwierciedlać zastosowaną metodę normalizacji, a nie rzeczywiste związki biologiczne pomiędzy stanem oksydacyjno–redukcyjnym a jakością nasienia (*Joao i wsp.*, 2022; *Castleton i wsp.*, 2022; *Gill i wsp.*, 2022; *Ballo i wsp.*, 2023). Wydaje się, że alternatywą w tym przypadku mogłoby być zastosowanie bardziej zaawansowanych metod analizy statystycznej, takich jak regresja wieloczynnikowa, która umożliwia jednoczesne uwzględnienie wielu zmiennych. Takie podejście pozwala na eliminację wpływu czynników zakłócających i tym samym umożliwia bardziej precyzyjną ocenę rzeczywistych relacji między indeksem ORP a jakością nasienia czy wynikami procedur ART (*Agarwal i wsp.*, 2019a; *Henkel i wsp.*, 2022; *Taomita i wsp.*, 2023).

regardless of actual changes in the redox potential (*Kavoussi et al.*, 2022; *Arafa etal.*, 2020). Consequently, some researchers question whether "raw/non-normalized" ORP values might more accurately reflect the true redox status of semen.

Another issue with normalizing sORP is its potential influence on correlation analyses with semen parameters. For example, the observed negative correlation between ORP index and sperm concentration may partially result from mathematical dependencies rather than direct biological relationships. Similarly, independent correlations between sperm concentration and total count, motility, morphology, or DNA fragmentation can influence the outcomes of correlation analyses between ORP index and other semen parameters. This approach may raise the risk of overinterpreting correlations that may only partially reflect the applied normalization method rather than the true biological relationships between redox status and semen quality (*Joao et al.*, 2022; *Castleton et al.*, 2022; *Gill et al.*, 2022; *Ballo et al.*, 2023). A better alternative would involve the use of advanced statistical methods, such as multivariate regression, which could account for multiple confounding variables. This approach can eliminate the effects of confounding factors and provide a more precise evaluation of the actual relationships between ORP index, semen quality, and ART outcomes (*Agarwal et al.*, 2019a; *Henkel et al.*, 2022; *Taomita et al.*, 2023).

Podsumowanie / Summary

Nie ulega wątpliwości, że wprowadzenie systemu MiOXSYS® było ważnym krokiem w kierunku stworzenia bardziej dostępnych, choć wciąż nieidealnych, narzędzi diagnostycznych do oceny stresu oksydacyjnego w nasieniu. Pomimo swojej innowacyjności i wykazywanej w wielu badaniach użyteczności klinicznej, pewne aspekty jego metodologii i interpretacji wyników wymagają dalszych badań i ewentualnego dopracowania w celu zapewnienia większej precyzji diagnostycznej.

Istotnym zagadnieniem wymagającym dalszych badań jest zasadność normalizacji wyników ORP względem koncentracji plemników, zwłaszcza

There is no doubt that the introduction of the MiOXSYS® system was a significant step toward the development of more accessible, though still imperfect, diagnostic tools for assessing oxidative stress in semen. Despite its innovative nature and clinically demonstrated value in numerous studies, certain aspects of its methodology and result interpretation require further investigation and refinement to ensure greater diagnostic precision.

The validity of normalizing sORP values to sperm concentration merits further investigation, particularly in the context of ongoing discussions about the

w kontekście dyskusji dotyczącej wpływu tej metody na interpretację wyników. Dodatkowo, potrzebne są badania weryfikujące jednocześnie wyniki nieznormalizowanego i znormalizowanego ORP w bardziej jednorodnych grupach pacjentów z określonym podłożem niepłodności męskiej, aby zrozumieć, w jakich przypadkach normalizacja względem koncentracji plemników rzeczywiście zwiększa dokładność diagnostyczną testu. Takie analizy mogłyby również wskazać sytuacje kliniczne, w których nieznormalizowane wyniki ORP byłyby bardziej przydatne lub wystarczające do oceny stresu oksydacyjnego w nasieniu. Ponadto, istotne jest ustalenie w jakim stopniu wartości nieznormalizowanego ORP odzwierciedlają właściwości plazmy nasienia, a w jakim stan redoks plemników. Dalsze badania w tych obszarach pozwolą na bardziej precyzyjne dostosowanie systemu MiOXSYS® do różnych scenariuszy klinicznych.

impact of the method on result interpretation. Studies are also needed to verify the potential of non-normalized and normalized ORP as indicators in more homogeneous groups of patients with specific underlying causes of male infertility. These findings would help determine cases where normalization relative to sperm concentration enhances the diagnostic accuracy of the test, and identify clinical situations where non-normalized ORP results would be more useful or sufficient for assessing oxidative stress in semen. Furthermore, it is important to determine the extent to which non-normalized ORP values reflect the properties of seminal plasma rather than the redox state of sperm. Such further research will enable more precise adaptation of the MiOXSYS® system to various clinical scenarios.

Finansowanie / Funding

Badania te zostały sfinansowane ze środków grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503/1-089-03/50311-002

This research was funded by Medical University of Lodz grant No 503/1-089-03/50311-002

Podziękowania / Acknowledgments

Chciałabym podziękować Edwardowi Lowczowskiemu, native speakerowi, z Centrum Języków Obcych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, za korektę językową tego artykułu.

I would like to thank Edward Lowczowski, a native speaker, from the Foreign Language Center of the Medical University of Lodz, for proofreading this article.

Piśmiennictwo / References

Agarwal A., Arafa M.,Chandrakumar R., Majzoub A., AlSaid S.,Elbardisi H.: A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation-reduction potential, a reliable and reproducible method. Andrology .2017a, 5(5), 939–945. doi: 10.1111/andr.12395. PMID: 28726302

Agarwal A., Bui A.D.: Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility. Investig Clin Urol. 2017, 58(6), 385–399. doi: 10.4111/icu.2017.58.6.385. PMID: 29124237

Agarwal A., Henkel R., Sharma R., Tadros N.N., Sabanegh E.: Determination of seminal oxidation-reduction potential (ORP) as an easy and cost-effective clinical marker of male infertility. Andrologia. 2018, 50(3). doi: 10.1111/and.12914. PMID: 29057493

Agarwal A., Panner Selvam M.K., Arafa M., Okada H., Homa S., Killeen A. i wsp.: Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. Asian J Androl. 2019a, 21(6), 565–569. doi: 10.4103/aja.aja_5_19. PMID: 31006711

Agarwal A.; Parekh N., Panner Selvam, M.K.; Henkel R., Shah R., Homa S.T. i wsp.: Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. World J. Mens Health 2019b, 37, 296–312. doi: 10.5534/wjmh.190055. PMID: 31081299

Agarwal A., Qiu E., Sharma R.: Laboratory assessment of oxidative stress in semen. Arab J Urol. 2017b, 16(1), 77–86. doi: 10.1016/j.aju.2017.11.008. PMID: 29713538

Agarwal A., Rana M., Qiu E., AlBunni H., Bui A., Henkel R.: Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. Andrologia. 2018, 50, 13126. doi: 10.1111/and.13126. PMID: 30569652

Agarwal A., Roychoudhury S., Sharma R., Gupta S., Majzoub A., Sabanegh E.: Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. Reprod Biomed Online. 2017c, 34(1), 48–57. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.10.008. PMID: 27839743

Agarwal A., Sharma R., Roychoudhury S., Du Plessis S, Sabanegh E.: MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. Fertil Steril. 2016, 106(3), 566–573.e10. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.05.013. PMID: 27260688

Agarwal A., Virk G., Ong C., du Plessis SS.: Effect of oxidative stress on male reproduction. World J Mens Health. 2014, 32(1), 1–17. doi: 10.5534/wjmh.2014.32.1.1. PMID: 24872947

Agarwal A., Wang S.M.: Clinical Relevance of Oxidation-Reduction Potential in the Evaluation of Male Infertility. Urology, 2017, 104, 84–89. doi: 10.1016/j.urology.2017.02.016. PMID: 28214572

Agarwal A.; Mulgund, A.; Hamada, A.; Chyatte, M.R.: A unique view on male infertility around the globe. Reprod. Biol. Endocrinol. 2015, 13, 37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1. PMID: 25928197

Aitken J.R., Fisher H.M.: Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays, 1994, 16(4), 259–267. doi: 10.1002/bies.950160409. PMID: 8031303

Aitken R., Drevet J., Moazamian A., Gharagozloo P.: Male Infertility and Oxidative Stress:A Focus on the Underlying Mechanisms. Antioxidants (Basel) 2022, 11, 306. doi: 10.3390/antiox11020306. PMID: 35204189

Aitken R., Drevet J.: The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two -Edged Sword. Antioxidants (Basel) 2020, 9, 111. doi: 10.3390/antiox9020111. PMID: 32012712

Aitken R.J., Gibb Z.: Sperm oxidative stress in the context of male infertility: current evidence, links with genetic and epigenetic factors and future clinical needs. Minerva Endocrinol. 2022, 47, 38–57. doi.org/10.23736/S2724-6507.21.03630-7. PMID: 35166469

Aitken RJ, Gharagozloo P.: The assessment of oxidative stress in human semen: chaos and confusion in pursuit of diagnostic precision. Reprod Biomed Online. 2024, 50(2), 104488. doi: 10.1016/j.rbmo.2024.104488. PMID: 39731844

Aitken RJ.: DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. Transl Androl Urol 2017, 6, S761-4. doi: 10.21037/tau.2017.09.13. PMID: 29082208

Aitken RJ.: Male reproductive ageing: a radical road to ruin. Hum Reprod, .2023, 38(10), 1861-1871. doi: 10.1093/humrep/dead157. PMID: 37568254

Alfaro -Gómez M., Fernández-Santos M.D.R., Jurado-Campos A., Soria-Meneses P.J., Montoro Angulo V. i wsp.: On Males, Antioxidants and Infertility (MOXI): Certitudes, Uncertainties and Trends. Antioxidants (Basel). 2023, 12(8), 1626. doi: 10.3390/antiox12081626. PMID: 37627621

Arafa M., Agarwal A., Said S., Majzoub A., Sharma R., Bjugstad K.B. i wsp.: Semen quality and infertility status can be identified through measures of oxidation-reduction potential. Andrologia. 2018 Mar;50(2). doi: 10.1111/and.12881. PMID: 28771782

Arafa M., Henkel R., Agarwal A., Majzoub A., Elbardisi H.: Correlation of oxidation-reduction potential with hormones, semen parameters and testicular volume. Andrologia. 2019, 51(5), e13258. doi: 10.1111/and.13258. PMID: 30809834

Arafa M., Henkel R., Agarwal A., Robert K., Finelli R., Majzoub A. i wsp.: Seminal oxidation-reduction potential levels are not influenced by the presence of leucocytospermia. Andrologia. 2020, 52(7), e13609. doi: 10.1111/and.13609. PMID: 32400005

Atchie B., Jarvis S., Bellon R., Barton T., Disalvo L., Salottolo K. i wsp.: Oxidationreduction potential parameters worsen following intraarterial therapy in patients with reduced collateral circulation and middle cerebral artery occlusions.Exp Ther Med. 2023, 25(6), 295. doi: 10.3892/etm.2023.11994. PMID: 37229324

Azzi A.: Oxidative Stress: What Is It? Can It Be Measured? Where Is It Located? Can It Be Good or Bad? Can It Be Prevented? Can It Be Cured? Antioxidants. 2022, 11:1431. doi: 10.3390/antiox11081431. PMID: 35892633

Balló A, Czétány P, Busznyákné KS, Márk L, *Mike N*, Török A, *i wsp.:* Oxido-Reduction Potential as a Method to Determine Oxidative Stress in Semen Samples. Int J Mol Sci. 2023 Jul 26, 24(15), 11981. doi: 10.3390/ijms241511981. PMID: 37569357

Barati E., Nikzad H., Karimian M.: Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. Cell Mol Life Sci. 2020, 77, 93–113. doi: 10.1007/s00018-019-03253-8. PMID: 31377843

Baskaran S., Finelli R., Agarwal A., Henkel R.: Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane? Andrologia2021;53:13577. doi: 10.1111/and.13577. PMID: 32271474

Bjugstad K.B., Rael L.T., Levy S., Carrick M., Mains C.W., Slone D.S. i wsp.: Oxidation-Reduction Potential as a Biomarker for Severity and Acute Outcome in Traumatic Brain Injury. Oxid Med Cell Longev. 2016, 6974257. doi: 10.1155/2016/6974257. PMID: 27642494

Castleton P., Gyawali P., Mathews N., Mutuku S.M., Sharkey D.J., McPherson N.O.: MiOXSYS® and OxiSperm® II assays appear to provide no clinical utility for determining oxidative stress in human sperm-results from repeated semen collections. Andrology. 2023, 11(8), 1566–1578. doi: 10.1111/andr.13356. PMID: 36455546

Dimitriadis F.; Tsounapi P.; Zachariou A.; Kaltsas A.; Sokolakis I.; Hatzichristodoulou, G. i wsp.: Therapeutic effects of micronutrient supplements on sperm parameters: Fact or Fiction? Curr. Pharm. Des. 2021, 27, 2757–2769. doi: 10.2174/1381612826666200415173537. PMID: 32294030

Dutta S., Sengupta P., Roychoudhury S., Chakravarthi S., Wang C.W., Slama P.: Antioxidant Paradox in Male Infertility: 'A Blind Eye' on Inflammation. Antioxidants (Basel). 2022,11(1),167. doi: 10.3390/antiox11010167. PMID: 35052671

Dutta S.; Sengupta P.; Slama P.; Roychoudhury S.: Oxidative Stress, Testicular Inflamatory Pathways, and Male Reproduction. Int J Mol Sci. 2021, 22, 10043. doi: 10.3390/ijms221810043. PMID: 34576205

Elbardisi H., Finelli R., Agarwal A., Majzoub A., Henkel R., Arafa M.: Predictive value of oxidative stress testing in semen for sperm DNA fragmentation assessed by sperm chromatin dispersion test. Andrology. 2020 May;8(3):610–617. doi: 10.1111/andr.12743. PMID: 31828966

Evans E.P.P., Scholten J.T.M., Mzyk A., Reyes-San-Martin C., Llumbet A.E., Hamoh T. i wsp.: Male subfertility and oxidative stress. Redox Biol. 2021, 46, 102071. doi: 10.1016/j.redox.2021.102071. PMID: 34340027

Fisher H.M., Aitken R.J.: Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. J Exp Zool. 1997, 277(5), 390–400. doi: 10.1002/(sici)1097-010x(19970401)277:5<390::aid-jez5>3.0.co;2-k. PMID: 9127958

Fraczek M., Kurpisz M.: The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2005, 59, 523-34.PMID: 16407791

Fraczek M., Wojnar L., Kamieniczna M., Piasecka M., Gill K., Kups M. i wsp.: Seminal Plasma Analysis of Oxidative Stress in Different Genitourinary Topographical Regions Involved in Reproductive Tract Disorders Associated with Genital Heat Stress. Int J Mol Sci. 2020 Sep 3;21(17):6427. doi: 10.3390/ijms21176427. PMID: 32899311

Garcia-Segura S., Ribas-Maynou J., Lara-Cerrillo S., Garcia-Peiró A., Castel AB., Benet J. i wsp.: Relationship of Seminal Oxidation-Reduction Potential with Sperm DNA Integrity and pH in Idiopathic Infertile Patients. Biology (Basel). 2020, 9(9), 262. doi: 10.3390/biology9090262. PMID: 32882928

Gill K., Kups M., Harasny P., Machalowski T., Grabowska M., Lukaszuk M., i wsp.: The Negative Impact of Varicocele on Basic Semen Parameters, Sperm Nuclear DNA Dispersion and Oxidation-Reduction Potential in Semen. Int J Environ Res Public Health. 2021, 18(11), 5977. doi: 10.3390/ijerph18115977. PMID: 34199549

Gill K., Machałowski T., Harasny P., Grabowska M., Duchnik E., Piasecka M.: Low human sperm motility coexists with sperm nuclear DNA damage and oxidative stress in semen. Andrology. 2024, 12(5), 1154-1169. doi: 10.1111/andr.13556. PMID: 38018344

Gill K., Machalowski T., Harasny P., Kups M., Grabowska M., Duchnik E., i wsp.: Male Infertility Coexists with Decreased Sperm Genomic Integrity and Oxidative Stress in Semen Irrespective of Leukocytospermia. Antioxidants (Basel). 2022, 11(10), 1987. doi: 10.3390/antiox11101987. PMID: 36290709

Gomez E., Buckingham D.W., Brindle J., Lanzafame F., Irvine D.S., Aitken R.J.: Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. J. Androl. 1996, 17, 276–287. PMID: 8792218

He Y., Zou L., Luo W., Yi Z., Yang P., Yu S., i wsp.: Heavy metal exposure, oxidative stress and semen quality: Exploring associations and mediation effects in reproductive -aged men. Chemosphere 2020, 244, 1254980. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125498. PMID: 31812049

Heldmaier K., Stoppe C., Goetzenich A., Foldenauer A.C., Zayat R., Breuer T. i wsp.: Oxidation-Reduction Potential in Patients undergoing Transcatheter or Surgical Aortic Valve Replacement. Biomed Res Int. 2018 Nov 14;2018:8469383. doi: 10.1155/2018/8469383. PMID: 30539023

Henkel R., Morris A, Vogiatzi P, Saleh R, Sallam H, Boitrelle F, i wsp.: Predictive value of seminal oxidation-reduction potential analysis for reproductive outcomes of ICSI. Reprod Biomed Online. 2022, 45(5), 1007-1020. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.05.010. PMID: 36055912

Henkel R., Sandhu I.S., Agarwal A.: The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? Andrologia. 2019, 51(1), e13162. doi: 10.1111/and.13162. PMID: 30259539

Homa ST, Vassiliou A.M., Stone J., Killeen A.P., Dawkins A., Xie J. i wsp.: A Comparison Between Two Assays for Measuring Seminal Oxidative

Stress and their Relationship with Sperm DNA Fragmentation and Semen Parameters. Genes (Basel). 2019, 10(3), 236. doi: 10.3390/genes10030236. PMID: 30893955

Joao F., Duval C., Bélanger M.C., *Lamoureux J., Xiao C.W., Ates S. i wsp.:* Reassessing the interpretation of oxidation-reduction potential in male infertility. Reprod Fertil. 2022, 3(2):67-76. doi: 10.1530/RAF-21-0005. PMID: 35514536

Juárez-Rojas L., Casillas F., López A., Betancourt M., Ommati M., Retana -Márquez S.: Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa. Andrologia. 2022, 54, 1–16. doi: 10.1111/and.14367. PMID: 35034376

Kavoussi P.K., Gilkey M.S., Machen G.L., Kavoussi K.S., Dorsey Ch.: Varicocele Repair Improves Static Oxidation Reduction Potential as a Measure of Seminal Oxidative Stress Levels in Infertile Men: A Prospective Clinical Trial Using the MiOXSYS System. Urology. 2022, 165, 193–197. doi: 10.1016/j.urology.2022.04.007. PMID: 35461918

Kowalczyk A.: The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. Reprod Sci, 2022, 29(5):1387-1394. doi: 10.1007/s43032-021-00795-w. PMID: 34845666

Kumar N., Singh A.: Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2018, 47, 565 -572.; doi: 10.1016/j.jogoh.2018.06.008. PMID: 30016715

Majzoub A., Arafa M., Mahdi M., Agarwal A., Al Said S., Al-Emadi I. i wsp.: Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. Arab J Urol. 2018, 16(1), 87-95. doi: 10.1016/j.aju.2017.11.014. PMID: 29713539

Majzoub A., Arafa M., El Ansari W. Mahdi M., Agarwal A., Al-Said S. i wsp.: Correlation of oxidation reduction potential and total motile sperm count: its utility in the evaluation of male fertility potential. Asian J Androl. 2020 May-Jun;22(3):317-322. doi: 10.4103/aja.aja_75_19. PMID: 31339113

Mancini A., Oliva A., Vergani E., Festa R., Silvestrini A.: The Dual Role of Oxidants in Male (In) fertility: Every ROSe Has a Thorn. Int J Mol Sciences. 2023, 24, 4994. doi: 10.3390/ijms24054994. PMID: 36902424

Marchlewicz M., Szypulska-Koziarska D., Grzegrzólka A.; Kruk J., Duchnik E., Wiszniewska B.: Ochrona przed stresem oksydacyjnym w męskim układzie płciowym. Pomeranian J Life Sci. 2016, 62(1), 44-52; doi: 10.21164/pomjlifesci.169

Martin -Hidalgo D., Bragado M., Batista A., Oliveira P., Alves M.: Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence. Antioxidants (Basel). 2019, 8:1 -21. doi: 10.3390/antiox8040089. PMID: 30959797

Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J.: A new method for measuring antioxidant activity. Biochem Soc Trans. 1993, 21(2), 95S. doi: 10.1042/bst021095s. PMID: 8359548

Moustakli E., Zikopoulos A., Skentou C., Katopodis P., Domali E., Potiris A. i wsp.: Impact of Reductive Stress on Human Infertility: Underlying Mechanisms and Perspectives. .Int J Mol Sci. 2024, 25(21), 11802. doi: 10.3390/ijms252111802. PMID: 39519353

Nago M., Arichi A., Omura N., Iwashita Y., Kawamura T., Yumura Y.: Aging increases oxidative stress in semen. Investig Clin Urol. 2021, 62, 233 -238. doi: 10.4111/icu.20200066. PMID: 33660452

Niu J., Chang Q., Xu J., Li J., Liu W., Chen Z. i wsp.: Relationship of the levels of reactive oxygen species in the fertilization medium with the outcome of in vitro fertilization following brief incubation. Front Endocrinol (Lausanne). 2023, 14, 1133566. doi: 10.3389/fendo.2023.1133566. PMID: 36950698

Omolaoye T.S., Skosana B.T., Ferguson L.M., Ramsunder Y., Ayad B.M., Du Plessis SS.: Implications of Exposure to Air Pollution on Male Reproduction: The Role of Oxidative Stress. Antioxidants (Basel). 2024, 13(1), 64. doi: 10.3390/antiox13010064. PMID: 38247488

Otasevic V., Stancic A., Korac A., Jankovic A., Korac, B.: Reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species in human male fertility. A crossroad of cellular signaling and pathology. Biofactors. 2020, 46, 206–219. doi: 10.1002/biof.1535. PMID: 31185138

Panday A., Sahoo M., Osorio D., Batra S.: NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity -associated pathologies. Cell Mol Immunol 2015, 12, 5–23. doi: 10.1038/cmi.2014.89. PMID: 25263488

Panner Selvam M.K., Agarwal A., Henkel R., Finelli R., Robert K.A., Iovine C. i wsp.: The effect of oxidative and reductive stress on semen parameters and functions of physiologically normal human spermatozoa. Free Radic Biol Med. 2020, 152, 375–385. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.008. PMID: 32165282

Panner Selvam M.K., Ambar R., Agarwal A., Henkel R.: Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. Andrologia. 2021, 53, 1–15. doi: 10.1111/and.13706. PMID: 32559347

Panner Selvam M.K., Baskaran S., O'Connell S., Almajed W., Hellstrom W.J.G., Sikka S.C.: Association between Seminal Oxidation-Reduction Potential and Sperm DNA Fragmentation-A Meta-Analysis. Antioxidants (Basel). 2022, 11(8), 1563. doi: 10.3390/antiox11081563. PMID: 36009282

Panner Selvam M.K., Henkel R., Sharma R., Agarwal A.: Calibration of redox potential in sperm wash media and evaluation of oxidation-reduction potential values in various assisted reproductive technology culture media using MiOXSYS system. Andrology. 2018, 6(2), 293–300. doi: 10.1111/andr.12461. PMID: 29314770

Rasmussen J.M.K., Dalgaard M.I.R., Alipour H., Dardmeh F., Christiansen O.B.: Seminal Oxidative Stress and Sperm DNA Fragmentation in Men from Couples with Infertility or Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. J Clin Med. 2024, 13(3), 833. doi: 10.3390/jcm13030833. PMID: 38337527

Ribas-Maynou J., Yeste M.: Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants.Biology (Basel). 2020, 9(4), 77. doi: 10.3390/biology9040077. PMID: 32290152

Ribeiro J.C., Braga P..C, Martins A.D., Silva B.M., Alves M.G., Oliveira P.F.: Antioxidants Present in Reproductive Tract Fluids and Their Relevance for Fertility. Antioxidants (Basel). 2021, 10(9), 1441. doi: 10.3390/antiox10091441. PMID: 34573073

Ritchie C., Ko E.Y.: Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. Andrologia. 2021, 53(1), e13581. doi: 10.1111/and.13581. PMID: 32323352

Sadeghi N., Boissonneault G., Tavalaee M., Nasr-Esfahani M.H.: Oxidative versus reductive stress: a delicate balance for sperm integrity. Syst Biol Reprod Med. 2023, 69(1), 20–31. doi: 10.1080/19396368.2022.2119181. PMID: 36215401

Sallam N., Hegab M., Mohamed F., El-Kaffash D.: Effect of oxidative stress in semen, follicular fluid and embryo culture medium on the outcome of assisted reproduction,. *Al-Azhar International Medical Journal*. 2021, 2(7), 11. doi.org/10.21608/aimj.2021.79536.1495

Sengupta P., Pinggera G.M., Calogero A.E., Agarwal A.: Oxidative stress affects sperm health and fertility -Time to apply facts learned at the bench to help the patient: Lessons for busy clinicians. Reprod Med Biol. 2024, (1), e12598. doi: 10.1002/rmb2.12598. PMID: 39224210

Symeonidis E.N., Evgeni E., Palapelas V., Koumasi D., Pyrgidis N., Sokolakis I. i wsp.: Redox Balance in Male Infertility: Excellence through Moderation-"Μέτρον ἄριστον"; Antioxidants (Basel). 2021, 10(10), 1534. doi: 10.3390/antiox10101534. PMID: 34679669

Takeshima T., Usui K., Mori K., Asai T., Yasuda K., Kuroda S. i wsp.: Oxidative stress and male infertility. Reprod Med Biol. 2020, 20(1), 41–52. doi: 10.1002/rmb2.12353. PMID: 33488282

Tan Y., Yuan Y., Yang X., Wang Y., Liu L.: Diagnostic value of oxidation-reduction potential for male infertility: a systematic review and meta-analysis. Transl Androl Urol. 2024, 13(7), 1228–1238. doi: 10.21037/tau-24-32. PMID: 39100838

Tanaka T., Kobori Y., Terai K., Inoue Y., Osaka A., Yoshikawa N., i wsp.: Seminal oxidation--reduction potential and sperm DNA fragmentation index increase among infertile men with varicocele. Hum Fertil. 2022, 25, 142–146. doi: 10.1080/14647273.2020.1712747. PMID: 31955637

Tantra R., Cackett A., Peck R., Gohil D., Snowden J.: Measurement of redox potential in nanoecotoxicological investigations. J Toxicol. 2012, 270651. doi: 10.1155/2012/270651. PMID: 22131988

Tomita K., Udayanga K.G.S., Satoh M., Hashimoto S., Morimoto Y.: Relation between semen oxidative reduction potential in initial semen examination and IVF outcomes. Reprod Med Biol. 2023, 22(1), e12501. doi: 10.1002/rmb2.12501. PMID: 36726595

Tvrdá E., Kňažická Z., Bárdos L., *Massányi P., Lukáč N.:* Impact of oxidative stress on male fertility - a review. Acta Vet Hung. 2011, 59(4), 465–484. doi: 10.1556/AVet.2011.034. PMID: 22079708

Vassiliou A., Martin C.H., Homa S.T., Stone J., Dawkins A., Genkova M.N. i wsp.: Redox potential in human semen: Validation and qualification of the MiOXsys assay. Andrologia. 2021, 53(2), e13938. doi: 10.1111/and.13938. PMID: 33377541

Wagner H., Cheng J.W., Ko E.Y.: Role of reactive oxygen species in male infertility: an updated review of literature. Arab J Urol 2017, 16, 35–43. doi: 10.1016/j.aju.2017.11.001. PMID: 29713534

Walczak-Jędrzejowska R.: Stres oksydacyjny a niepłodność męska. Część I: czynniki wywołujące stres oksydacyjny w nasieniu. Postępy Andrologii On Line, 2015, 2 (1), 16–33.

Wdowiak N., Wójtowicz K., Wdowiak-Filip A., Pucek W., Wróbel A., Wróbel J. i wsp. Environmental Factors as the Main Hormonal Disruptors of Male Fertility. J Clin Med. 2024, 13(7), 1986. doi: 1 10.3390/jcm13071986. PMID: 38610751

World Health Organization.WHO LaboratoryManual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th ed.;WHO Press: Geneva, Switzerland, 2021. https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787

Zargari F., Rahaman M., KazemPour R., Hajirostamlou M.: Arsenic, Oxidative Stress and Reproductive System. J Xenobiot. 2022, 12:214–222. doi: 10.3390/jox12030016. PMID: 35893266

Zhao J., Dong X., Hu X., Long Z., Wang L., Liu Q. i wsp.: Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta -analysis. Sci Rep. 2016, 6, 1–10. doi: 10.1038/srep22386. PMID: 26932683