

**Gdański Uniwersytet Medyczny**



**mgr Ewa Pastuszek**

**Ocena wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność mężczyzn.  
Porównanie dwóch metod badawczych: TUNEL i Comet assay.**

**Evaluation of the effects sperm DNA fragmentation on male fertility.  
A comparison of two methods: TUNEL and Comet assay.**

**Rozprawa doktorska**

Promotor pracy:

**prof. dr hab. Krzysztof Łukaszuk**

Promotor pomocniczy:

**dr Jolanta Kiewisz**

**Zakład Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego  
Katedra Pielęgniarstwa**

**Gdańsk 2018**

## Spis treści

<b>1.</b>	<b>Wykaz prac będących przedmiotem rozprawy .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Wstęp .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Nieplodność męska .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2</b>	<b>Metody oceny płodności męskiej .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>Wpływ uszkodzeń DNA plemników na płodność .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4</b>	<b>Metody badania fragmentacji DNA plemników.....</b>	<b>10</b>
<b>2.5</b>	<b>Metody wspomaganego rozrodu .....</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>Cel pracy.....</b>	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>Materiał i metody .....</b>	<b>15</b>
<b>5.</b>	<b>Badania wstępne .....</b>	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>Omówienie prac będących przedmiotem rozprawy .....</b>	<b>19</b>
<b>7.</b>	<b>Wnioski.....</b>	<b>23</b>
<b>8.</b>	<b>Streszczenie w języku polskim .....</b>	<b>24</b>
<b>9.</b>	<b>Streszczenie w języku angielskim.....</b>	<b>26</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>28</b>
<b>11.</b>	<b>Prace będące przedmiotem rozprawy .....</b>	<b>37</b>
<b>12.</b>	<b>Oświadczenia współautorów.....</b>	<b>38</b>

## 1. Wykaz prac będących przedmiotem rozprawy

1. E. Pastuszek, J. Kiewisz, P.M. Kulwikowska, M. Lukaszuk, K. Lukaszuk; **Sperm parameters and DNA fragmentation of balanced chromosomal rearrangements carriers**; Folia Histochemica et Cytobiologica. 2015;53(4):314-321. doi:10.5603/fhc.a2015.0032 (praca oryginalna)  
(IF: 1.060; MNiSW: 15)

2. K. Lukaszuk, E. Pastuszek, A. Samojedny; **Comment on: "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures" by Gatimel et al.**, Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2016;33(9):1253-12534. doi: 10.1007/s10815-016-0746-9 (list do redakcji)  
(IF: 2.163; MNiSW: 20)

3. E. Pastuszek, J. Kiewisz, P. Skowronska, J. Liss, M. Lukaszuk, A. Bruszczyńska, G. Jakiel, K. Lukaszuk; **An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human sperm on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay**; Andrology. 2017;5(2):392-398. doi: 10.1111/andr.12324 (praca oryginalna)  
(IF: 2.734; MNiSW: 35)

**Łącznie:** IF: 5.957; MNiSW: 70

## 2. Wstęp

### 2.1. Niepłodność męska

Niepłodność definiowana jest jako stan niemożności zajścia w ciążę po roku utrzymywania przez parę regularnych stosunków płciowych bez stosowania jakiegokolwiek formy antykoncepcji, z przeciętną częstotliwością 3–4 stosunków tygodniowo [1].

Z problemem niepłodności zmagają się co szósta para na świecie [2, 3]. W związku z tak dużą skalą zjawiska, Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) uznała niepłodność za chorobę społeczną. Statystyki WHO podają, że 20-30% przypadków ograniczenia sprawności rozrodczej związanych jest z niepłodnością męską, 20-35% z niepłodnością żeńską, 25-40% wynika z problemów u obojga partnerów, natomiast 10-20% przypadków stanowi niepłodność o nieznanym etiologii [4].

Pojęcie męskiej niepłodności powstało stosunkowo niedawno. Jeszcze w pierwszej połowie XX wieku, uważano, że za bezdzietność pełną odpowiedzialność ponosi kobieta. O problemach związanych z męską płodnością zaczęto mówić po II Wojnie Światowej. Zapoczątkowało to wprowadzenie przez Światową Organizację Zdrowia norm jakości nasienia, które opublikowano dopiero w 1980 roku. Normy te kilkakrotnie zmieniano. Aktualnie obowiązuje edycja V z 2010 roku [5]. Trudności z określeniem wartości referencyjnych jakości nasienia świadczą o problemie definiowania samego zjawiska oraz o trendzie spadkowym parametrów nasienia. Aktualnie uznaje się, że wynik jest prawidłowy (normozoospermia) gdy: koncentracja wynosi  $\geq 39$  mln plemników w ejakulacie, ruch postępowy wykazuje  $\geq 32\%$  plemników oraz  $\geq 4\%$  plemników jest prawidłowych pod względem budowy morfologicznej [5].

Klinicznie niepłodność męska może objawiać się niemożnością współżycia płciowego oraz różnego stopnia zaburzeniami jakości nasienia [6], które mogą być kategoryzowane z uwagi na objętość ejakulatu, koncentrację plemników oraz ich ruchliwość i morfologię.

Gdy w jednej porcji ejakulatu znajduje się  $< 0,5$  ml nasienia mówi się o aspermii, która może być spowodowana niedrożnością dróg wyprowadzających nasienie, wynikającą z występowania wad rozwojowych (np. obustronną niedrożnością nasieniowodów) a także urazami bądź odbyciem dużej ilości ejakulacji w krótkim czasie. Hipospermia czyli obniżona objętość ejakulatu (0,5-2,0 ml) może świadczyć np. o schorzeniach prostaty (stanach zapalnych, nowotworach), częściowym wstecznym wytrysku, niedoborze androgenów, jak również zbyt krótkim okresie abstynencji seksualnej. Z kolei zbyt duża objętość ejakulatu,

określana jako hiperspermia (>6,0 ml), może mieć związek z zapaleniem pęcherzyków nasiennych lub prostaty [5].

Całkowity brak plemników w nasieniu definiowana jako azoospermia, może wynikać z nosicielstwa aberracji chromosomowych (zespół Klinefeltera), mikrodelecji w genie *AZF*, wad wrodzonych powodujących niedrożność/brak nasieniowodów lub może to być efekt uboczny niektórych leków, radioterapii lub chemioterapii. Kryptozoospermia to zmniejszone stężenie plemników (poniżej 1 mln/ml), przy czym w badaniu ogólnym nasienia pod mikroskopem nie obserwuje się plemników. Pojedyncze plemniki widoczne są dopiero w osadzie, po odwirowaniu próbki. Gdy liczba plemników wynosi <15 mln/ml ejakulatu (lub <39 mln w całej uzyskanej objętości rozpoznaje się oligozoospermię [7, 8].

Z ruchliwością natomiast związane jest pojęcie astenozoospermii, sytuacja, w której ruch progresywny wykazuje <32% plemników [5].

Z nieprawidłowościami związanymi z budową morfologiczną plemników łączy się z kolei pojęcie teratozoospermii, sytuacja, w której plemniki o prawidłowej budowie stanowią <4% wszystkich plemników [5].

Gdy trzy powyższe nieprawidłowości (obniżona koncentracja, ruchliwość i morfologia) występują jednocześnie, określa się je terminem oligoastenoteratozoospermia (OAT).

Nie jest możliwe wskazanie głównego czynnika wpływającego na jakość nasienia. Obniżenie jakości nasienia może być spowodowane przez przebyte choroby np. zapalenie jąder wywołane wirusem różyczki (*Rubella virus*) lub bakteryjne zapalenia najądrzy powodowane najczęściej przez chlamydię (*Chlamydia trachomatis*). Na jakość nasienia mają również wpływ wszystkie choroby ogólnoustrojowe o różnym stopniu nasilenia, poczynając od urazów, przeziębień przebiegających z gorączką, na choroby nowotworowej kończąc. O płodności męskiej decydują również przyjmowane leki, stosowane metody terapeutyczne (np. chemioterapia i radioterapia, leki hormonalne, a nawet antybiotyki) oraz różnego rodzaju używki (np. papierosy, alkohol, narkotyki). Ponadto jakość nasienia jest determinowana przez gospodarkę hormonalną [2, 6, 8, 9]. Wymieniając czynniki wpływające na jakość męskiego nasienia należy także podkreślić znaczenie zaburzeń genetycznych, które stanowią co najmniej 15% przyczyn niepłodności męskiej. Związane są one między innymi z występowaniem dodatkowego chromosomu X w kariotypie (zespół Klinefeltera), obecnością translokacji chromosomowych, mutacji genu *CFTR* i mikrodelecji w genie *AZF* obecnym na chromosomie Y [8, 10– 12].

Co zrozumiałe, czynniki etiologiczne sprzyjające niepłodności męskiej występują w zmiennym nasileniu w różnych obszarach geograficznych. Można z dużym

prawdopodobieństwem stwierdzić, że jest to skutkiem sytuacji ekonomicznej mieszkańców, która warunkuje zarówno zapadalność na choroby zakaźne jak i choroby cywilizacyjne. Sytuacja ekonomiczna obszarów geograficznych moduluje również czynniki środowiskowe (np. zanieczyszczenie środowiska naturalnego) i społeczne (np. dostęp do używek, stres lub rodzaj wykonywanej pracy), które w bardzo istotny sposób wpływają na męską płodność [6, 13]. Pomimo poznania tak wielu czynników wpływających na płodność, aż w 30-40% przypadków nie udaje się jednoznacznie zidentyfikować przyczyny niepłodności [1, 14].

## **2.2 Metody oceny płodności męskiej**

Badanie nasienia, obok badania andrologicznego i wywiadu klinicznego, jest podstawowym narzędziem oceny męskiego czynnika niepłodności. Jakość nasienia nie jest parametrem stałym, dlatego aby uzyskać wiarygodny wynik, powinno się wykonać co najmniej dwa badania w odstępie minimum 3-tygodniowym [5, 8].

Badanie ogólne nasienia polega na analizie próbki ejakulatu pod kątem istotnych parametrów takich jak koncentracja plemników, ich ruchliwość i żywotność oraz parametrów morfologicznych aby wykluczyć ewentualne nieprawidłowości w tym zakresie. Przed badaniem należy zachować od 2 do 7 dni abstynencji seksualnej. Materiał do badania uzyskuje się drogą masturbacji. Prawidłowy ejakulat bezpośrednio po oddaniu ma półpłynną konsystencję. Zwykle po kilku - kilkunastu minutach konsystencja zaczyna stopniowo zmieniać się na płynną. Jeśli upłynnienie nie nastąpi w ciągu 60 min od momentu oddania nasienia, należy upłynnić je mechanicznie lub enzymatycznie. Po całkowitym upłynnieniu należy przystąpić do badania [5].

W ogólnym badaniu oceniane są parametry makroskopowe takie jak: objętość, barwa, lepkość, pH i czas jaki był potrzebny do upłynnienia ejakulatu. Precyzyjny pomiar objętości (mierzony przez ważenie próbki lub pomiar objętości w wyskalowanym cylindrze) jest niezbędny do wykonania obliczenia całkowitej liczby plemników i innych elementów morfologicznych w badanej próbce. Barwa prawidłowego nasienia jest szaro-opalizująca lub mleczno-szara, nieprzezroczysta. Żółtawa barwa może świadczyć o przewlekłym stanie zapalnym i związanym z nim wzrostem liczby leukocytów. Żółte zabarwienie nasienia może świadczyć również o żółtaczce lub być wynikiem przyjmowania leków. Barwa czerwono-brunatna świadczy o domieszce krwi charakterystycznej dla ostrego stanu zapalnego.

Pomiar pH nasienia należy wykonać przy użyciu papierków wskaźnikowych o zakresie pH 6,0-10,0. Wartość pH ejakulatu odzwierciedla równowagę kwasowo-zasadową pomiędzy wydzielinami pęcherzyków nasiennych i gruczołu krokowego [5].

Podczas wstępnej oceny mikroskopowej preparatu bezpośredniego (powiększenie 100x) stwierdza się występowanie pasm śluzu i nieprawidłowości w zachowaniu plemników (nadmierna agregacja lub aglutynacja) oraz obecność innych elementów morfotycznych (ciałka reszkowe, bakterie, nabłonki, kryształki sperminy) [5].

W nasieniu mogą znajdować się również leukocyty oraz komórki spermatogenezy określane wspólnie terminem „komórki okrągłe”. Koncentrację komórek okrągłych można określić manualnie metodą komorową lub poprzez analizę rozmazu zabarwionego metodą Papanicolau, zestawem Diff-Quick lub May-Grunwald-Giemzy (MGG). Większość leukocytów w nasieniu to granulocyty, rzadziej spotykane są limfocyty, monocyty i makrofagi. Cechą charakterystyczną granulocytów jest produkowanie enzymu zwanego peroksydazą co jest wykorzystywane do rozpoznania leukocytów i odróżnienia ich od innych komórek okrągłych obecnych w nasieniu. W tym celu stosuje się test laboratoryjny zwany LeucoScreen, który wykorzystuje fakt, że w obecności peroksydazy, benzydyna ulega utlenieniu przez  $H_2O_2$ . Leukocyty, zabarwiają się na kolor brązowy, co pozwala na ich odróżnienie od innych komórek okrągłych, które mają kolor różowy. Obecność leukocytów  $\geq 1$  mln/ml nazywana jest leukocytospermią. Może ona świadczyć o infekcji w układzie rozrodczym i powinna skłaniać do wykonania posiewu nasienia [5].

Koncentrację plemników można określić manualnie metodą komorową przy użyciu np. komory Neubauera (powiększenie 200x lub 400x). Obecnie jednak, w tym celu częściej wykorzystywany jest komputerowy system wspomaganiej analizy nasienia (ang. Computer-assisted sperm analysis, CASA), umożliwiający obiektywną i szybką ocenę koncentracji oraz ruchliwości plemników. Pozwala on na dokładną ocenę parametrów ruchu plemnika takich jak: średnia prędkość przeciętnego toru, średnia prędkości ruchu postępowego, średnia amplituda bocznych odchyień główki, prostoliniowość i wiele innych parametrów, dzięki którym dokonuje się podziału plemników na subpopulacje o różnym tempie ruchu i typie progresji [5].

Żywotność plemników można zbadać wykonując barwienie eozyną, wykorzystując przepuszczalność błony komórkowej martwych plemników, w wyniku czego wybarwiają się one na czerwono. Alternatywnie, można zastosować test hipoosmotyczny, w którym tylko w żywych plemnikach występuje obrzęk witki. To proste badanie pozwala określić integralność błon komórkowych i ich zdolność do utrzymania właściwego gradientu

osmotycznego [5]. Wartość prognostyczna tych testów do oceny niepłodności męskiej jest ograniczona ze względu na to, że mówią one bardziej o żywotności plemników niż o ich rzeczywistej zdolności do zapłodnienia komórki jajowej.

Ostatnim parametrem określanym podczas standardowego badania nasienia jest ocena morfologii plemników zgodnie z kryteriami Krügera [15]. Morfologię ocenia się przy znacznie większym powiększeniu niż wcześniej wymienione parametry (1000x), co pozwala na lepszą ocenę poszczególnych elementów budowy każdego plemnika, które wcześniej zostały zabarwione jedną z trzech rekomendowanych przez WHO metod tj.: Papanicolaou, Shorr lub zestawem Diff-Quik. Przy ocenie bierze się pod uwagę między innymi kształt główki plemnika, długość i kształt wstki, prawidłowość budowy wstawki oraz obecność kropli cytoplazmatycznych [5, 15].

Niestety, możliwości podstawowej analizy nasienia są mocno ograniczone i nie pozwalają na ocenę zdolności plemników do zapłodnienia komórki jajowej. Przyjmuje się zatem, iż nieprawidłowy wynik analizy nasienia jest przesłanką do stwierdzenia udziału mężczyzny w etiopatogenezie niepłodności partnerskiej. Wynik prawidłowy jednak nie wyklucza jego udziału. Słaba wartość predykcyjna obecnie stosowanych podstawowych testów seminologicznych może wynikać z braku metody do adekwatnej oceny struktur wewnątrzkomórkowych plemnika, decydujących o jego funkcji biologicznej. Metody takie powinny oceniać stan integralności błon komórkowych, aktywność mitochondriów oraz integralność plemnikowego DNA. Logicznym wydaje się stwierdzenie, że zaplemnienie komórki jajowej przez plemnik z nienaruszonym DNA ma duże znaczenie dla uzyskania zapłodnienia i dalszego prawidłowego rozwoju zarodka [16, 17].

### **2.3 Wpływ uszkodzeń DNA plemników na płodność**

Materiał genetyczny obecny w plemnikach jest zabezpieczony przed uszkodzeniami dzięki obecności bariery krew-jądro, a także poprzez wiązanie z histonami, proteinami i innymi białkami oraz metylację DNA [18]. Skuteczność tej ochrony bywa jednak często upośledzona. Dodatkowo, w końcowym etapie spermatogenezy nieczynny jest system naprawy DNA, w związku z czym komórki te nie mają mechanizmu, który umożliwiłby im naprawę uszkodzeń powstałych podczas transportu przez najądrza oraz po wytrysku. Stwierdzono jednak, że oocyty podczas zapłodnienia, a także zarodki na wczesnym etapie rozwoju mają pewną zdolność naprawy uszkodzeń DNA plemników. Naprawa DNA przez komórkę jajową w czasie zapłodnienia i bezpośrednio po nim jest jednym z najistotniejszych



procesów mających miejsce przed zagnieżdżeniem zarodka w błonie śluzowej macicy [19]. Udowodniono, że plemniki z uszkodzonym DNA mogą wnikać do oocytu i zapłodnić go [20–22]. Jednak zwiększony poziom fragmentacji DNA plemnika ma negatywny wpływ na dalsze etapy powodując nieprawidłowy rozwój a nawet zatrzymanie rozwoju zarodka [23–26].

Etiologia uszkodzeń DNA plemników wydaje się być wieloczynnikowa. Wiadomo, że wysokie poziomy reaktywnych form tlenu [11, 27] lub błędy na etapie protaminacji, czyli zamiany histonów na protaminy, mogą powodować nieodwracalne uszkodzenia w DNA [19, 28]. Nieodłącznym elementem spermatogenezy jest również apoptoza [17, 29, 30]. Istnieją również czynniki środowiskowe, które mogą zwiększać uszkodzenie DNA plemników. Wielokrotnie opisywano, że czynniki zewnętrzne, takie jak: stosowanie niektórych leków, zanieczyszczenie środowiska, palenie papierosów, gorączka, wysoka temperatura jąder, żyłki powrózka nasiennego i zaawansowany wiek mogą przyczyniać się do uszkodzenia DNA plemników [28, 31–34], a co za tym idzie do niepłodności.

Szacuje się, iż u prawie 20% pacjentów, przyczyną niepłodności idiopatycznej jest podwyższony poziom fragmentacji DNA plemnikowego. Dlatego badanie fragmentacji DNA plemników może być wyznacznikiem jakości materiału genetycznego oraz prognostycznym wskaźnikiem skuteczności zapłodnienia, rozwoju ciąży i urodzenia dziecka [16, 35, 36].

Uszkodzenie DNA plemników zmniejsza szanse na zajęcia w ciążę naturalną. Wielu badaczy potwierdziło, że wśród par, u których partner ma wysoki procent plemników z uszkodzeniem DNA obserwuje się niski potencjał do zapłodnienia i wydłużony czas potrzebny do zajęcia w ciążę [37–41]. Wysoki poziom uszkodzeń DNA plemników jest również wiązany z niższymi wskaźnikami wystąpienia ciąży po inseminacji (ang. intrauterine insemination, IUI) [42, 43]. Zdecydowanie dokładniej został zbadany związek między uszkodzeniami DNA plemników, a współczynnikami oceniającymi częstotliwość występowania ciąż po przeprowadzeniu zabiegu zapłodnienia *in vitro* (ang. in vitro fertilisation, IVF). Jednakże, interpretacja wyników jest utrudniona ze względu na heterogeniczność badanych grup, zastosowanie różnych testów do oceny fragmentacji, przyjmowania różnych wartości granicznych oraz stosowanie różnych technik zapłodnienia. Część badań wskazuje, że uszkodzenie DNA plemników jest powiązane z niższymi wskaźnikami szacującymi ilość ciąż [36, 44–48] oraz żywych urodzeń po IVF [49]. Niektóre badania, sugerują jednak, że uszkodzenia DNA plemników mają jedynie niewielki wpływ na częstość występowania ciąż przy IVF [50–52]. W przypadku docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ang. intracytoplasmic sperm injection; ICSI) większość badań pokazuje, że uszkodzenie DNA

plemników nie ma wpływu na uzyskanie ciąży [46, 50, 51, 53–56] ani żywych urodzeń [57]. Bardzo prawdopodobne wydaje się, że rygorystyczny proces selekcji plemnika łagodzi potencjalne niepożądane działanie uszkodzeń DNA [58].

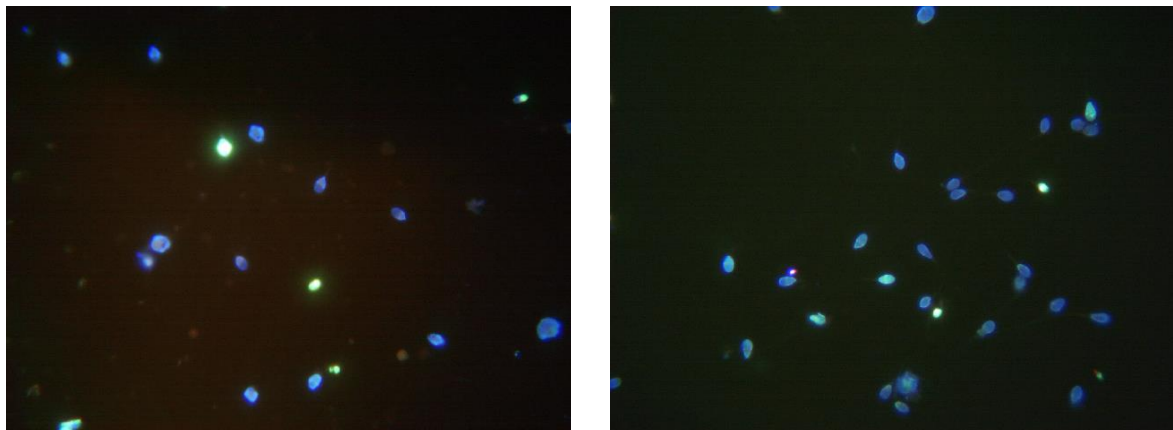
Pomimo kontrowersji dotyczących klinicznego zastosowania badania fragmentacji DNA plemników zostało ono uznane przez Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu (ang. American Society for Reproductive Medicine, ASRM) [59], Amerykańskie Towarzystwo Urologiczne (ang. American Urological Association, AUA) [60] oraz Europejskie Towarzystwo Urologiczne (ang. European Association of Urology, EAU) [8] jako jeden z czynników rokowniczych, który powinien podlegać ocenie podczas rutynowej diagnostyki.

## **2.4 Metody badania fragmentacji DNA plemników**

Metody oceny fragmentacji DNA można podzielić na dwie grupy. Pierwsze obejmują metody wykrywające pęknięcia nici DNA (zarówno jednoniciowe, jak i dwuniciowe), które zachodzą w sposób naturalny lub losowy w cząsteczce DNA. Do tej grupy możemy zaliczyć metodę TUNEL (ang. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) oraz metodę kometową w pH obojętnym (ang. neutral Comet assay). W związku z tym, że pęknięcia DNA zwiększają jego podatność na denaturację, drugi rodzaj technik obejmuje testy, które mierzą podatność chromatyny, a zwłaszcza DNA, na denaturację w określonych warunkach. W tej grupie technik znajduje się badanie struktury chromatyny (ang. Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA) oraz metoda kometowa w pH silnie zasadowym (ang. alkaline Comet assay).

Metoda TUNEL wykrywająca pęknięcia nici DNA w plemnikach pierwszy raz opisana została przez Wojciecha Gorczycę i wsp. [61]. Opiera się ona na najistotniejszej cesze apoptozy, jaką jest fragmentacja DNA na małe odcinki długości ok. 180 par zasad. Do wolnych końców pofragmentowanego DNA, przy udziale nukleotydylotransferazy (TdT – terminal deoxynucleotidyl transferase), przyłączane są nukleotydy znakowane digoksygeniną (digoksynadUTP). Emitowany podczas reakcji przyłączania znacznika do końców DNA sygnał zwiększa się wprost proporcjonalnie do liczby pęknięć w DNA. Metoda ta wykrywa jednocześnie pojedyncze i dwuniciowe uszkodzenia DNA, wskazując liczbę komórek z uszkodzeniem DNA, nie pozwalając jednak określić stopnia jego uszkodzenia w pojedynczej komórce. Procent plemników z pofragmentowanym DNA określany jest poprzez bezpośrednią obserwację przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Rycina 1) lub metodą cytometrii przepływową. Brak jest jednak jednoznacznie określonych

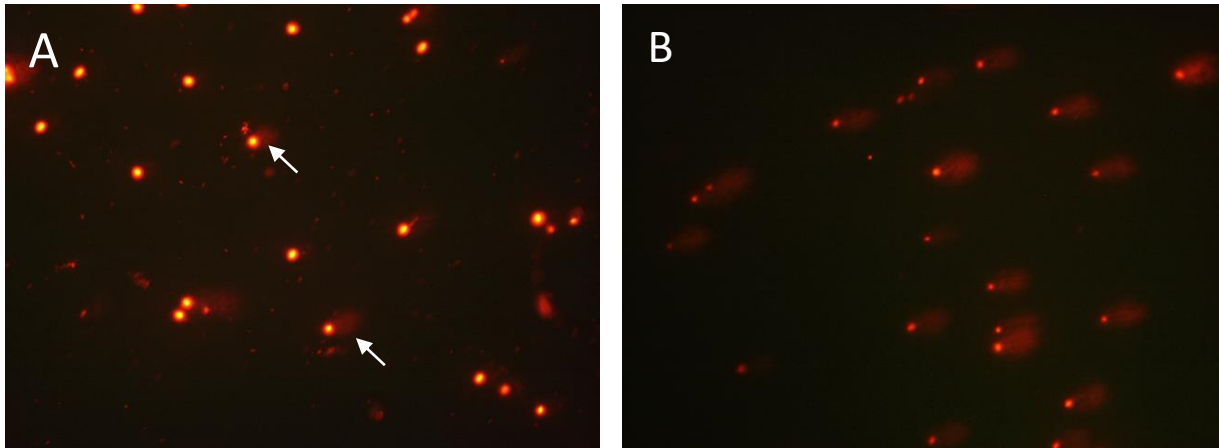
wartości granicznych dla tego testu, a wartości podawane przez różnych autorów wahają się od 4 do nawet 36,5% [57, 62].



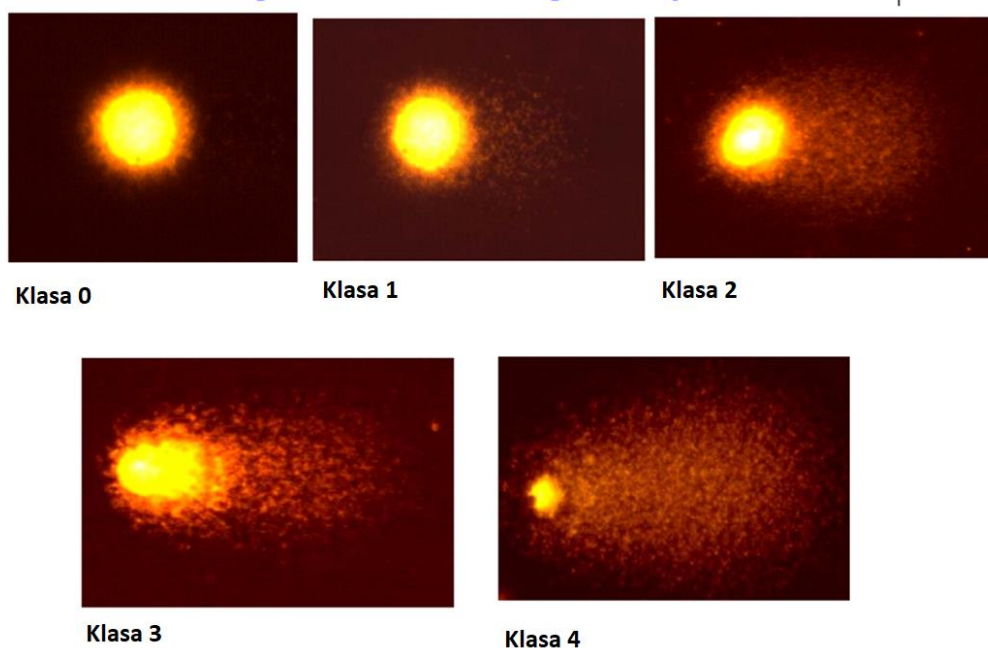
**Rycina 1.** Obrazy preparatów mikroskopowych plemników wybarwionych podczas wykonywania metody TUNEL (zielone światło fluorescencyjne - plemniki pofragmentowane, niebieskie światło fluorescencyjne – plemniki prawidłowe).

Metoda kometowa, nazywana także elektroforezą żelową pojedynczych komórek (ang. Single Cell Gel Electrophoresis; SCGE) wprowadzona została przez O. Östlinga i K.J. Johansona w 1984 roku [63]. Komórki zatopione w agarozie są poddawane lizie, co powoduje uwolnienie DNA z jądra komórkowego. Zastosowanie buforu lizującego o wysokiej sile jonowej z dodatkiem odczynnika silnie redukującego mostki dwusiarczkowe w plemnikach wspomaga dysocjację białek od DNA. Następnie w warunkach neutralnych lub w alkalicznych przeprowadzana jest elektroforeza. W środowisku neutralnym uwidaczniają się głównie pęknięcia dwuniciowe, w zasadowym -jedno- i dwuniciowe, natomiast w skrajnie zasadowym -jedno- i dwuniciowe oraz miejsca apurynowe i apirymidynowe (tzw. miejsca AP) [34, 64]. Podczas elektroforezy, DNA pozostający w miejscu zatopionej komórki, migruje w stronę anody z prędkością zależną od stopnia fragmentacji. Szybkość migracji DNA przy zachowaniu stałych warunków procedury, pozostaje proporcjonalna do stopnia uszkodzenia DNA. Ostatnim etapem metody kometowej jest ocena mikroskopowa. Obraz uszkodzonych komórek przypomina kometę. „Ogon” stanowią fragmenty nici DNA uwolnione ze struktur jądrowych w wyniku pęknięć, a „głowa” to nienaruszone DNA (Rycina 2). W przeciwieństwie do innych metod, niewątpliwą zaletą metody kometowej jest możliwość różnicowania typów uszkodzeń, w zależności od środowiska, w jakim przeprowadzana jest elektroforeza. Pozwala ona również na obserwacje nie tylko udziału

procentowego pofragmentowanych plemników w całej populacji, ale także na obserwację stopnia fragmentacji w pojedynczych plemnikach (Rycina 3). Jednak brak standardowych protokołów, utrudnia porównanie wyników różnych autorów.



**Rycina 2.** Obraz preparatów mikroskopowych wykorzystujących metodę kometową do oceny stopnia fragmentacji DNA. A – kilka plemników pofragmentowanych w stopniu znacznym (zaznaczone strzałkami), B – większość plemników pofragmentowanych w stopniu znacznym.



**Rycina 3.** Klasyfikacja uszkodzeń DNA plemników, przy pomocy metody kometowej. Ilość DNA znajdująca się w tzw. „ogonie” komety jest wprost proporcjonalna do ilości pęknięć nici DNA w danym plemniku.

Najbardziej popularną metodą oceny struktury chromatyny plemnikowej jest SCSA wykorzystująca cytometrię przepływową. W tej metodzie, do oceny struktury chromatyny plemnikowej wykorzystywany jest oranż akrydyny (AO) jako barwnik. Ta relatywnie prosta metoda umożliwia pomiar dużej liczby plemników, a ponadto charakteryzuje się wysokim stopniem powtarzalności [65]. W przypadku plemników z prawidłową strukturą chromatyny, poddanych denaturacji w kwaśnym środowisku, oranż akrydyny łączy się z dwuniciowym DNA emitując światło o barwie zielonej. Z kolei w plemnikach z uszkodzoną chromatyną barwnik ten łączy się z pofragmentowanym DNA emitując światło czerwone. Badanie, oprócz indeksu DFI (ang. DNA fragmentation index), czyli odsetka plemników z uszkodzeniami DNA, mierzy także odsetek plemników o niedojrzałej chromatynie - HDS (ang. High DNA Stainability). Zaletą SCSA jest wystandaryzowany protokół, minimalizujący różnice między laboratoriami oraz określone wartości graniczne umożliwiające rozróżnianie płodnych mężczyzn od tych, z obniżonym potencjałem reprodukcyjnym [29, 66].

Wyżej wymienione metody należą do najczęściej stosowanych w diagnostyce męskiej niepłodności. Każdy z tych testów umożliwia ilościowe oszacowanie ogólnego stanu DNA plemników, bez wskazania specyficznych sekwencji DNA, które uległy zmianie, w rezultacie dostarczając ograniczonych informacji na temat charakteru uszkodzeń DNA, ich dokładnej etiologii i patogenezy utraty integralności.

## **2.5 Metody wspomaganego rozrodu**

W latach 60-tych XX wieku, pozaustrojowe zapłodnienie ludzkich komórek jajowych, pozostawało ciągle w strefie marzeń wielu naukowców. Podstawowe problemy utrudniające jego realizację obejmowały m.in. otrzymanie dojrzałych ludzkich komórek jajowych oraz odpowiednie przygotowanie plemników – kapacytację – proces, zachodzący naturalnie w kobiecych drogach rodnych [67].

Pierwsze udane próby otrzymania dojrzałych ludzkich komórek jajowych wyizolowanych z tkanki jajnikowej zaprzeczały koncepcji Gregorego Pincusa [68], mówiącej o tym, że ludzkie oocyty zachowują się analogicznie do komórek mniejszych ssaków i dojrzewają spontanicznie w czasie ok. 12 h po izolacji. W rzeczywistości czas dojrzewania komórek większych ssaków, w tym ludzi jest dłuższy i wynosi do ok. 36 h [69]. Problem kapacytacji plemników rozwiązany został w 1968 r. przez Barrego Bavister'a, który ustalił, że kluczowym czynnikiem wpływającym na kapacytację jest pH roztworu [67, 70].

Obserwacje te wykorzystane zostały przez Roberta G. Edwardsa i jego współpracowników opisujących na łamach czasopisma Nature, proces pierwszego pozaustrojowego zapłodnienia ludzkich komórek jajowych uzyskanych z tkanki jajnikowej [71]. Proces zapłodnienia *in vitro* opisany przez Edwardsa naśladował procesy odbywające się w ludzkim organizmie, w których jeden z plemników znajdujący się w otoczeniu dojrzałej komórki jajowej wnika do jej wnętrza przez osłonkę przejrzystą, co skutkuje podjęciem przez oocyt drugiego podziału mejotycznego, fuzją przedjądrzy oraz dalszymi podziałami mitotycznymi [72].

Późniejsze prace Edwardsa opisywały już nie tylko sam proces zapłodnienia, ale również hodowlę zarodków do stadium blastocysty, możliwą dzięki dokładnej kontroli pH, ciśnienia osmotycznego i składników pożywki [67, 73]. Stąd już niedaleka droga do najważniejszego wydarzenia w historii rozwoju technik wspomaganego rozrodu, jakim były narodziny pierwszego dziecka poczętego poza ustrojem matki. W wyniku prac, prowadzonych przez zespół brytyjskich lekarzy i embriologów pod kierunkiem Robert G. Edwardsa oraz Patricka C. Steptoe 25 lipca 1978 roku w Anglii urodziła się Luise Brown – pierwszy w historii ludzkości noworodek poczęty w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego [69]. Skuteczność pierwszych prób, które były przeprowadzane w cyklach naturalnych, była stosunkowo niska. Późniejsze wprowadzenie kontrolowanej farmakologicznej stymulacji jajników w celu uzyskania wzrostu i dojrzewania pęcherzyków Graafa oraz indukcji jajczkowania znacznie zwiększyło jej skuteczność [74]. Niestety, metoda stosowana przez Steptoea i Edwardsa, nazwana później klasycznym zapłodnieniem *in vitro*, w skrócie IVF, wymagała również zastosowania nasienia charakteryzującego się dobrymi parametrami zarówno pod względem liczby plemników jak i ich ruchliwości, dlatego skuteczna była tylko w przypadku pacjentów, u których parametry nasienia nie odbiegały znacząco od normy. Przełom w leczeniu męskiej niepłodności stanowiło opracowanie w 1991 roku, przez Gianpiero Palermo metody ICSI [75]. Zapłodnienie z zastosowaniem techniki ICSI polega na wstrzyknięciu do komórki jajowej, za pomocą bardzo cienkiej szklanej igły (mikropipety), pojedynczego, wybranego pod względem morfologii i żywotności plemnika. Zastosowanie tej techniki umożliwiło poczęcie potomka mężczyznom, z bardzo słabymi parametrami nasienia, którzy wcześniej uznawani byli za niepłodnych. Kolejną modyfikacją metody ICSI było zastosowanie techniki mikroiniekcji pod dużym powiększeniem (ang. Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection with Motile Sperm Organelle Morphology Examination; IMSI-MSOME), umożliwiającej dokładniejszą ocenę plemnika wprowadzanego do komórki jajowej, pod kątem jego kształtu oraz liczby, jakości i rozmieszczenia wakuoli na jego powierzchni [76]. Tak dokładną ocenę umożliwia obserwacja plemników pod mikroskopem świetlnym

z zastosowaniem bardzo dużego powiększenia optycznego ok. 600-1400 razy z dodatkowym powiększeniem cyfrowym.

### **3. Cel pracy**

Celem niniejszych prac było dokonanie analizy parametrów nasienia pacjentów, u których zastosowano procedurę ICSI i porównanie dwóch metod badawczych służących do oceny stopnia fragmentacji DNA plemników pod kątem ich czułości i swoistości oraz wartości progowych. Porównanie wzmiankowanych metod pozwoliło odpowiedzieć na pytanie, która z nich ma większy potencjał w kontekście ewaluacji męskiej płodności oraz oszacowania szansy na uzyskanie ciąży oraz żywego urodzenia podczas zastosowania zapłodnienia pozaustrojowego. Poruszono również zagadnienia wpływu różnych czynników (tj. nosicielstwo aberracji chromosomowych, morfologia plemników) na jakość nasienia (szczególnie stopnia fragmentacji DNA plemników) oraz powodów trudności w interpretacji wyników badań.

### **4. Materiał i metody**

Przeprowadzone badania zostały zaakceptowane przez lokalną Komisję Bioetyczną.

Badania wykonano na próbkach uzyskanych od mężczyzn, którzy byli pacjentami Kliniki Leczenia Niepłodności INVICTA w Gdańsku. Parametry nasienia oceniano zgodnie z wytycznymi WHO 2010 [5]. Podczas badań wykorzystywano dwie metody oceny fragmentacji DNA metodę TUNEL oraz metodę kometową, które badają rzeczywiste uszkodzenia DNA.

Dyskutując wyniki przeprowadzonych eksperymentów analizowano dostępne piśmiennictwo z zakresu badania nasienia, wpływu badanych parametrów na płodność oraz wyniki metod rozrodu wspomaganego. Szczególny nacisk położono na znaczenie uszkodzenia DNA plemników.

## 5. Badania wstępne

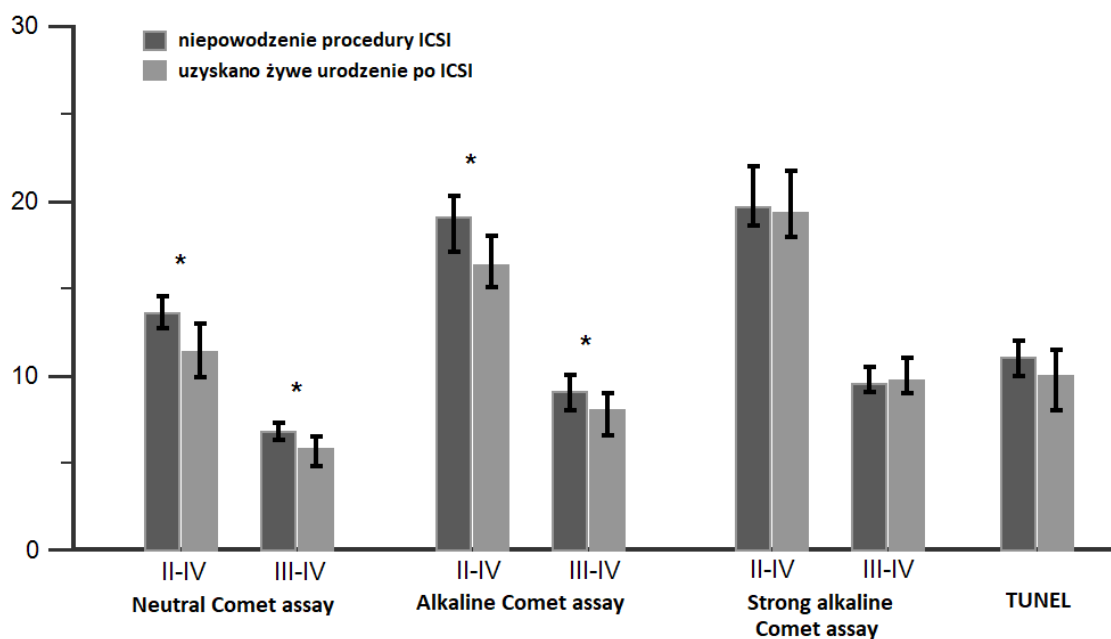
W ramach przygotowania, przeprowadziłam szeroko zakrojone badania wstępne, na grupie par, u których zastosowano procedurę ICSI. Próbki nasienia pochodzące od 277 mężczyzn zostały poddane ogólnemu badaniu nasienia wg wytycznych WHO 2010. Materiał pacjentów został także przeanalizowany pod kątem fragmentacji DNA plemników dwiema metodami: TUNEL oraz metodą kometową (warianty: neutralny, zasadowy i silnie zasadowy). Stosując metodę kometową sumowałam plemniki z co najmniej średnim (suma klas II-IV) i wysokim (suma klas III-IV) stopniem uszkodzenia DNA plemników.

W badaniu wyszczególniłam 2 grupy: pierwszą stanowiły pary, u których uzyskano żywe urodzenie, drugą zaś pacjenci, u których program leczenia zakończył się niepowodzeniem. Celem prac było porównanie grup pod względem fragmentacji DNA plemników ocenianych obiema wyżej wymienionymi metodami. Oceniłam również parametry czułości i swoistości metod oraz wyznaczyłam dla nich wartości progowe pozwalające na oszacowanie szansy na uzyskanie żywego urodzenia po zastosowaniu techniki ICSI.

Nie stwierdziłam istotnych statystycznie różnic między wiekiem kobiet, poziomem hormonów (hormon anty-Müllerowski, lutropina, folitropina, estradiol, progesteron), liczbą wystymulowanych pęcherzyków i pobranych dojrzałych komórek jajowych, współczynnikiem zapłodnień, liczbą podanych do macicy zarodków i dniem transferu. Nie występowały także różnice w zakresie wieku mężczyzn i podstawowych parametrów nasienia (czas abstynencji, objętość, koncentracja, ruchliwość i żywotność plemników oraz liczba komórek okrągłych).

Badanie fragmentacji DNA plemników z zastosowaniem metody kometowej w warunkach neutralnych i zasadowych wykazało, że średni procent plemników z co najmniej średnim (suma klas II-IV) oraz z wysokim (suma klas III-IV) stopniem degradacji DNA w grupie, gdzie uzyskano żywe urodzenie, był statystycznie znamienne niższy niż w grupie, w której doszło do niepowodzenia. Zależności takiej nie zaobserwowałam podczas badania fragmentacji DNA plemników metodą TUNEL i metodą kometową w silnie zasadowym pH (Rycina 4).





**Rycina 4.** Odsetek uszkodzeń DNA plemników w badanych grupach. Wyniki przedstawiono jako: mediana  $\pm$ 95% CI.

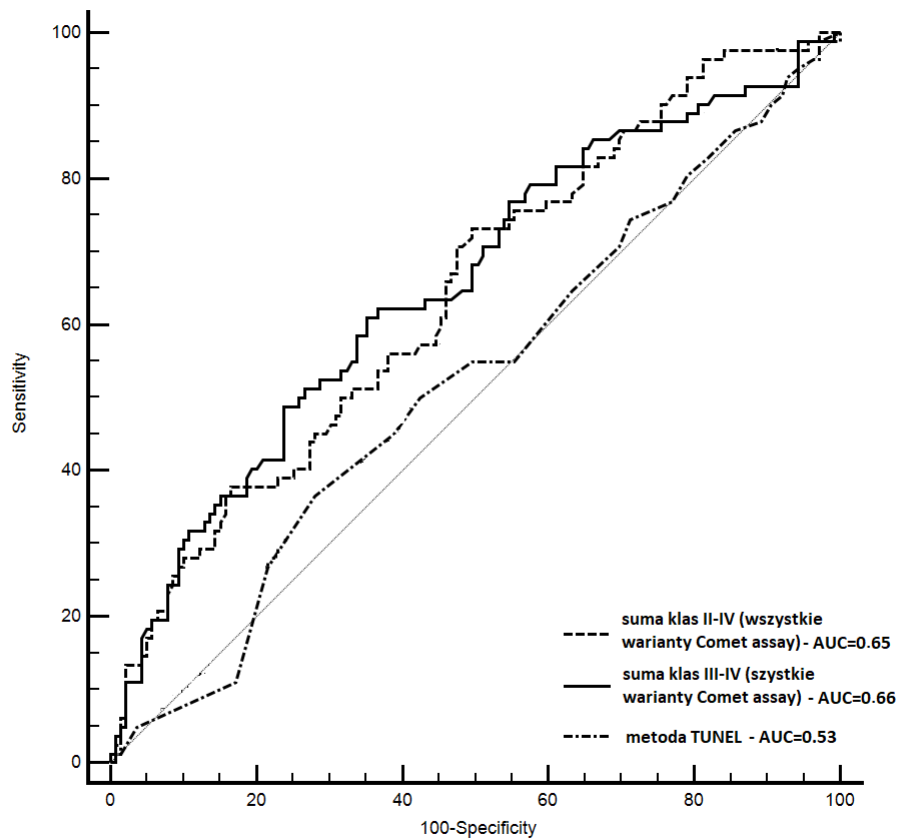
**Tabela 1.** Wartości prognostyczne uszkodzenia DNA plemników w przewidywaniu żywych urodzeń po zastosowaniu procedury ICSI.

	Grupa	AUC (95% CI)	Czułość	Specyficzność	Wartość progowa
Metoda kometowa (wariant neutralny)	II-IV	0.59 (0.53 - 0.65)	54.90	61.85	$\leq 11.80$
	III-IV	0.58 (0.52 - 0.64)	86.27	30.64	$\leq 9.20$
Metoda kometowa (wariant zasadowy)	II-IV	0.60 (0.53 - 0.66)	78.82	41.43	$\leq 20.40$
	III-IV	0.59 (0.52 - 0.65)	75.29	38.57	$\leq 10.70$
Metoda kometowa (wariant silnie zasadowy)	II-IV	0.52 (0.45 - 0.58)	87.76	21.08	$\leq 29.80$
	III-IV	0.50 (0.44 - 0.56)	40.82	65.66	$\leq 10.90$
Metoda TUNEL		0.53 (0.47 - 0.59)	49.04	58.96	$\leq 9.00$

CI (ang. Confidence Interval, CI) - przedział ufności, AUC (ang. Area under the curve) - powierzchnia pod krzywą.

Tabela 1 przedstawia wartości prognostyczne uszkodzeń DNA plemników w przewidywaniu żywych urodzeń po zastosowaniu procedury ICSI. Pola pod wykresem krzywej ROC (ang. Receiver Operating Characteristic) oznaczanego jako AUC mieszczą się w zakresie 0.50-0.60. Wyznaczone optymalne wartości progowe dla metody TUNEL są niższe niż w metodzie kometowej (zależność dotyczy wszystkich wariantów). Różnice te wynikają z odmiennych właściwości charakterystycznych metod.

Ponadto wieloczynnikowy model regresji logistycznej, uwzględniający wyniki co najmniej średniego (suma klas II-IV) oraz wysokiego (suma klas III-IV) stopnia degradacji DNA badany jednocześnie wszystkimi wariantami metody kometowej, pozwala na lepsze prognozowanie wyniku procedury ICSI (Rycina 5).



**Rycina 5.** Wieloczynnikowy model predykcyjny uwzględniający wyniki stopnia degradacji DNA badany jednocześnie wszystkimi wariantami metody kometowej oraz metodą TUNEL.

## 6. Omówienie prac będących przedmiotem rozprawy

**Sperm parameters and DNA fragmentation of balanced chromosomal rearrangements carriers;** E. Pastuszek; J. Kiewisz; P.M. Kulwikowska, M. Lukaszuk, K. Lukaszuk; *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2015;53(4):314-21. doi: 10.5603/fhc.a2015.0032

Translokacje zrównoważone (wzajemne i Robertsonowskie) to najczęściej spotykane przegrupowania struktur chromosomowych zidentyfikowane u ludzi. Zwykle nie powodują konsekwencji fenotypowych, jednak mogą wpływać na płodność. U nosicieli translokacji podczas mejozy dochodzi do zwiększenia prawdopodobieństwa produkcji gamet o niezrównoważonym kariotypie. Skutkuje to występowaniem nawracających poronień lub zwiększonym ryzykiem urodzenia dziecka z wadą genetyczną [77].

Aberracje chromosomowe są jednym z głównych czynników genetycznych odpowiedzialnych za występowanie niepłodności męskiej. Aberracje chromosomowe występują u 2-8% mężczyzn cierpiących na niepłodności czyli około 10 razy częściej niż w populacja ogólnej [12, 78–80].

Wielu autorów opisuje zwiększone prawdopodobieństwo wykrycia aberracji u pacjentów ze zmniejszoną ilością plemników w nasieniu [12, 79, 81]. Niestety brakuje badań określających parametry takie jak żywotność czy poziom fragmentacji DNA u nosicieli takich zaburzeń. Dostępne prace opierają się na niewielkich grupach badanych, które porównywane są z dawcami nasienia [82–85] spełniającymi restrykcyjne wymagania pod względem wszystkich wymienionych parametrów.

Celem pracy była szczegółowa ocena parametrów nasienia w grupie mężczyzn będących nosicielami translokacji zrównoważonych i porównanie ich z parametrami wybranych losowo mężczyzn z prawidłowym kariotypem. Podczas retrospektywnej analizy zebrałam dane pochodzące, aż od 84 mężczyzn, którzy byli nosicielami translokacji zrównoważonych (49 - translokacji wzajemnych i 35 – translokacji Robertsonowskich). Grupę kontrolną stanowiło 57 wybranych losowo mężczyzn o normalnym kariotypie, z par, u których przyczyną niepłodności był czynnik jajowodowy. Jest to pierwsza praca, w której analizie została poddana tak liczna grupa badana.

Badania cytogenetyczne wykonano po przeprowadzeniu hodowli limfocytów krwi obwodowej, przy użyciu standardowej procedury oraz zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Systemu Nazewnictwa Cytogenetycznego (ang. International System for

Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN) [86]. Standardowe badanie nasienia wykonano zgodnie z wytycznymi WHO z 2010 roku [5]. Fragmentację DNA plemników zbadano metodą TUNEL z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego.

Występowanie nieprawidłowej liczby plemników było częstsze wśród nosicieli translokacji Robertsonowskich (74,3%) w porównaniu do pozostałych grup (42,9% w grupie nosicieli translokacji wzajemnych i 28,1% w grupie kontrolnej). Koncentracja, ruchliwość i żywotność plemników była najniższa w grupie nosicieli translokacji Robertsonowskich. Natomiast grupa nosicieli translokacji wzajemnych i grupa kontrolna nie wykazały różnic statystycznie istotnych pod względem badanych cech. Warty podkreślenia jest fakt braku statystycznie istotnych różnic poziomu fragmentacji DNA pomiędzy nosicielami obu badanych rearanżacji chromosomowych w porównaniu do osób z prawidłowym kariotypem.

**Comment on: "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures" by Gatimel et al., K. Lukaszuk, E. Pastuszek, A. Samojedny; Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2016 Sep;33(9):1253-4. doi: 10.1007/s10815-016-0746-9.**

Zarówno przegląd piśmiennictwa dotyczącego metod wspomaganego rozrodu, jak również badania własne, nie pozwalają na wysnucie jednoznacznych wniosków dotyczących skuteczności ICSI oraz IMSI. Część z wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań można wiązać z problemami metodycznymi, które opierają się na podstawowych błędach w ocenie stosowanych systemów wykorzystywanych do procedury wyboru plemnika i sztucznego zapłodnienia komórki jajowej. Dlatego, celem listu było zwrócenie uwagi na problem, który niestety jest notorycznie powtarzany w wielu artykułach i wynika z niezajomości podstawowych zasad optyki.

Mikroskop powiększa obraz w dwóch etapach. Ostateczne powiększenie to iloczyn powiększenia obiektywu i okularu. Zasadniczo nie ma górnego limitu dla powiększenia mikroskopu, natomiast są ograniczenia dla powiększenia użytecznego. Podstawowym ograniczeniem jest zdolność rozdzielcza mikroskopu. Rozdzielczość zależy od apertury numerycznej obiektywu, apertury numerycznej kondensora oraz długości fali, jaka była użyta do obserwacji. Jeżeli przekroczona zostanie zdolność rozdzielcza, dalsze powiększanie nic już nie wniesie. Takie dodatkowe powiększenie nazywa się „pustym powiększeniem”, co oznacza, że została przekroczona rzeczywista i użyteczna zdolność rozdzielcza mikroskopu,

a obserwowany obraz jest tylko większy i mniej ostry, ale nie pokazuje większej ilości szczegółów [87, 88].

Brakuje publikacji, w których podawane są wszystkie parametry pozwalające obliczyć realne powiększenia i rozdzielczość użytego mikroskopu. Powoduje to bardzo nieprecyzyjne określenie, jaka rozdzielczość jest stosowana w danej metodzie. Przykładowo, podczas ISCI, niektórzy autorzy, dokonują wyboru plemnika z zastosowaniem powiększenia 200x, a inni, pisząc o tej samej procedurze, mają na myśli powiększenie 400x. Dodatkowo, nie są nigdzie podane parametry, które umożliwiłyby obliczenia rozdzielczości uzyskanego obrazu. Sytuacja ta uniemożliwia rzetelną i jednoznaczną interpretację otrzymywanych wyników, a w szczególności ich porównywanie.

Co więcej w artykułach pada stwierdzenie, że plemniki mogą być obserwowane pod powiększeniem nawet 6000 – 10000x. Takie podejście jest bardzo mylące i prowadzi do błędnego przeświadczenia, że takie powiększenia możemy uzyskać w mikroskopach optycznych, co oczywiście nie jest prawdą.

**An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human sperm on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay;** E. Pastuszek, J. Kiewisz, P. Skowronska, J. Liss, M. Lukaszuk, A. Bruszczyńska, G. Jakiel, K. Lukaszuk; *Andrology*. 2017 Mar;5(2):392-398. doi: 10.1111/andr.12324.

Chociaż kliniczne znaczenie morfologii plemników jest wciąż dyskusyjne, niektóre badania pokazują, że dokładny pomiar parametrów morfologicznych odgrywa bardzo istotną rolę w określaniu męskiej płodności [89, 90]. Liczne badania wskazują, że istnienie zależności między nieprawidłową budową plemników a wynikami procedury ICSI, a także odsetkiem ciąż zależy od morfologii plemnika wprowadzonego do komórki jajowej. Badania dowiodły, że wykorzystanie techniki służącej do oceny w czasie rzeczywistym morfologii organelli ruchliwych plemników (ang. Intracytoplasmatic Morphology-selected Sperm Injection; IMSI,) zwiększa skuteczność procedury docytoplazmatycznego wstrzyknięcia plemnika u par, u których wcześniej nie udało się uzyskać ciąży [90]. IMSI pozwala na uzyskanie większego odsetka implantacji oraz ciąż klinicznych, a jednocześnie powoduje zmniejszenie odsetka wczesnych, samoistnych poronień [91]. Istnieją nieliczne badania oceniające wpływ budowy morfologicznej oraz obecności wakuoli na fragmentację DNA plemników [92–95], jednak nie prowadzą one do jednoznacznych wniosków.

Celem badania było określenie związku między uszkodzeniami DNA a obecnością w plemnikach wakuoli. Plemniki zostały pozyskane od 10 pacjentów podchodzących do zabiegu ICSI. Analizie poddałam 3930 ruchliwych plemników, które wybrałam pojedynczo przy użyciu mikromanipulatora i podzieliłam na cztery klasy MSOME. Następnie wykonałam analizę kometową. Zastosowaną metodę wybrałam ze względu na jej wysoką czułość oraz możliwość rozróżnienia typów uszkodzeń DNA plemnika. Było to pierwsze na świecie wykorzystanie tej metody do tego typu badań.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że im bardziej prawidłowa morfologia i mniej wakuoli tym niższy stopień fragmentacji DNA. Jednak, nawet plemniki w klasie I MSOME nie są wolne od uszkodzeń DNA. Tak więc obserwacja wakuoli jądrowych, plemników, w czasie rzeczywistym, za pomocą mikroskopu optycznego, nie jest wystarczająca do optymalizacji metody i wyboru plemników pozbawionych uszkodzeń DNA, może ona jednak znacząco zredukować ryzyko wyboru uszkodzonego plemnika. Poniekąd można tłumaczyć tym fakt, że w części badań, gdzie do wyboru plemnika zastosowanego do zapłodnienia komórki jajowej używano metody ICSI bądź IMSI nie znajdowano statystycznie istotnych różnic w stopniu fragmentacji DNA plemników między grupami w których udało się uzyskać ciążę i w grupach gdzie doszło do niepowodzenia.

## 7. Wnioski

Przeprowadzone badania są indywidualnym wkładem w rozwój naukowej i praktycznej wiedzy dotyczącej niepłodności męskiej związanej z występowaniem fragmentacji DNA plemników u osób potencjalnie zdrowych i będących nosicielami translokacji. Wnioski wynikające z realizacji podjętych badań zweryfikowały hipotezy stawiane w literaturze naukowej oraz zwróciły uwagę na problemy metodyczne uniemożliwiające rzetelną i jednoznaczną interpretację dotychczas prezentowanych wyników.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że:

- Metoda kometowa wykazuje większy potencjał w szacowaniu szansy na uzyskanie ciąży oraz żywego urodzenia podczas zastosowania techniki ICSI. Co więcej wieloczynnikowy model regresji logistycznej, uwzględniający wyniki badania wszystkimi wariantami metody kometowej jednocześnie, pozwala na jeszcze lepsze prognozowanie wyniku.
- Pod względem koncentracji, ruchliwości i żywotności plemników grupa nosieli translokacji wzajemnych nie różniła się istotnie statystycznie od grupy kontrolnej. Natomiast nosiciele translokacji Robertsonowskich, mieli najniższe parametry. W badanych grupach nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic w poziomie fragmentacji DNA plemników.
- Autorzy publikacji naukowych powinni być zobligowani do podawania parametrów, niezbędnych do obliczenia realnego powiększenia mikroskopu i uzyskanej rozdzielczości stosowanej podczas procedury wyboru plemnika do sztucznego zapłodnienia komórki jajowej. Pozwoli to wyeliminować przynajmniej część wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań.
- Prawidłowa morfologia i mniej wakuoli w główce plemnika koreluje z niższym stopniem fragmentacji jego DNA. Jednak, nawet plemniki zaklasyfikowane jako klasa I MSOME nie są wolne od uszkodzeń DNA. Techniki oceny morfologii organelli ruchliwych plemników w czasie rzeczywistym nie są wystarczające do optymalnego wyboru plemników (pozbawionych uszkodzeń DNA), jednak mogą znacząco zredukować ryzyko wyboru uszkodzonego plemnika

## 8. Streszczenie w języku polskim

Dane WHO wykazują, że problem niepłodności dotyczy ok. 15-20% par w na świecie z czego aż w ok. 45% przypadków niepłodność wynika z czynnika męskiego. Najczęściej spotykaną przyczyną męskiej niepłodności jest niska jakość nasienia związana z obniżoną koncentracją, ruchliwością lub morfologią. Jednak w ok. 10-20% przypadków etiologia niepłodności pozostaje niewyjaśniona.

Na jakość nasienia wpływa bardzo dużo czynników i niestety nie jest możliwe wskazanie jednego głównego. Zaburzenia te powodowane są przez przebyte choroby (wirusowe lub bakteryjne zapalenia układu moczowo płciowego, nowotwory), urazy, przyjmowane leki, używki, czynność hormonalną oraz zaburzenia genetyczne.

Badanie nasienia, obok badania andrologicznego i wywiadu klinicznego, jest podstawowym narzędziem oceny czynnika męskiego niepłodności. Badanie ogólne nasienia polega na analizie próbki ejakulatu pod kątem istotnych parametrów makro i mikroskopowych takich jak: objętość, pH, czas aglutynacji, koncentracja plemników, ruchliwość, żywotność, obecność leukocytów i morfologia. Słaba wartość predykcyjna obecnie stosowanych podstawowych testów seminologicznych może wynikać z braku oceny stanu integralności plemnikowego DNA.

Materiał genetyczny obecny w plemnikach jest zabezpieczony przed uszkodzeniami na wiele sposobów ale skuteczność tej ochrony bywa często upośledzona. Szacuje się, iż u prawie 20% pacjentów z idiopatyczną niepłodnością wynika to z podwyższonego poziomu fragmentacji plemnikowego DNA. Brak mechanizmów naprawczych w dojrzałych plemnikach powoduje, że badanie fragmentacji DNA plemnika może być wyznacznikiem jakości materiału genetycznego oraz prognostycznym wskaźnikiem skuteczności zapłodnienia, rozwoju ciąży i urodzenia dziecka.

Metody oceny fragmentacji DNA możemy podzielić na dwa typy. Pierwszy obejmuje metody wykrywające pęknięcia DNA, które zachodzą w sposób naturalny lub losowy w cząsteczce DNA (TUNEL oraz Comet assay (wariant neutralny)). Drugi rodzaj technik obejmuje testy, które mierzą podatność chromatyny na denaturację w określonych warunkach (SCSA oraz Comet assay (wariant zasadowy)).

Cykl prac poświęcony jest wpływowi różnych czynników takich jak np.: nosicielstwo translokacji czy morfologia plemników na wyniki badania nasienia ze szczególnym uwzględnieniem stopnia fragmentacji DNA oraz powodów trudności w interpretacji wyników badań dotyczących metod rozrodu wspomaganego.



Zwiększone prawdopodobieństwo wykrycia aberracji u pacjenta z obniżoną liczną plemników w nasieniu jest opisywane przez wielu autorów. Jednak z reguły badania nie skupiają się na porównaniu innych parametrów, a jeśli już to porównywane są z parametrami dawców. W swoim badaniu postanowiłam zastosować inne podejście i porównać nosicieli translokacji do losowo wybranych mężczyzny z prawidłowym kariotypem. Pod względem koncentracji, ruchliwości i żywotności plemników grupa nosicieli translokacji wzajemnych nie różniła się istotnie statystycznie od grupy kontrolnej. Natomiast nosiciele translokacji Robertsonowskich, mieli najniższe parametry. W badanych grupach nie wykazałam jednak statystycznie istotnych różnic w poziomie fragmentacji DNA plemników.

Zarówno przegląd piśmiennictwa dotyczącego metod wspomaganego rozrodu, jak również badania własne, nie pozwalają na wysnucie jednoznacznych wniosków. Część z wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań wynika z niezajomości podstawowych zasad optyki. Autorzy publikacji naukowych powinni być zobligowani do podawania parametrów, niezbędnych do obliczenia realnego powiększenia mikroskopu i uzyskanej rozdzielczości stosowanej podczas procedury wyboru plemnika przed procedurą zapłodnienia. Pozwoli to wyeliminować przynajmniej część wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań.

Kliniczne znaczenie przeprowadzania badań morfologii plemników jest wciąż dyskusyjne. Niektóre badania pokazują, że dokładny pomiar parametrów morfologicznych odgrywa istotną rolę w określaniu męskiej płodności. Celem kolejnego badania było określenie związku między uszkodzeniami DNA a obecnością w plemnikach wakuoli. Prawidłowa morfologia i mniej wakuoli w główce plemnika koreluje z niższym stopniem fragmentacji jego DNA. Jednak, nawet plemniki zaklasyfikowane jako klasa I MSOME nie są wolne od uszkodzeń DNA. Techniki oceny morfologii organelli ruchliwych plemników w czasie rzeczywistym nie są wystarczające do dokonania wyboru optymalnego plemnika, jednak mogą znacząco zredukować ryzyko wyboru plemnika uszkodzonego.

Przeprowadzone badania są indywidualnym wkładem w rozwój naukowej i praktycznej wiedzy dotyczącej niepłodności męskiej związanej z występowaniem fragmentacji DNA plemników. Wnioski wynikające z realizacji podjętych badań zweryfikowały hipotezy stawiane w literaturze naukowej oraz zwróciły uwagę na problemy metodyczne uniemożliwiające rzetelną i jednoznaczną interpretację dotychczas prezentowanych wyników.

## **9. Streszczenie w języku angielskim**

According to WHO data infertility affects about 15-20% of couples worldwide, and in up to approx. 45% of cases, infertility results from the male factor. The most common cause of male infertility is low quality of sperm directly associated with a reduced sperm count, significantly reduced motility or changes in morphology. However, in about 10-20% of cases, the etiology of infertility remains unexplained.

Sperm quality is affected by a variety of factors and unfortunately it is not possible to indicate which one is primary. These disorders are caused by past diseases (viral or bacterial genitourinary tract infections, cancer), injuries, medications taken, stimulants used, hormonal activity and genetic disorders.

Sperm analysis, along with andrological evaluation and review of medical history, is the basic tool for assessing male infertility. The general sperm analysis is based on the analysis of the sperm sample to measure macro- and microscopic parameters such as: volume, pH, agglutination time, sperm concentration, motility, vitality, presence of leukocytes and morphology. The poor predictive value of currently used basic sperm tests may be due to the lack of adequate assessment of sperm DNA integrity.

The genetic material present in sperm is protected against damage in many ways, but the effectiveness of this protection is often impaired. It is estimated that almost 20% of patients with idiopathic infertility have an increased level of sperm DNA fragmentation. The lack of corrective mechanisms in mature sperm means that testing sperm DNA fragmentation may be a determinant of the quality of its genetic material and a prognostic indicator of the effectiveness of fertilization, development of pregnancy and chances for a live birth.

There are two main types of methods for assessing DNA fragmentation. The first includes methods for detecting DNA breaks that occur naturally or randomly in the DNA molecule (TUNEL and Comet assay (neutral variant)). The second type of methods includes tests that measure susceptibility of chromatin for denaturation under specific conditions (SCSA and Comet assay (alkaline variant)).

The series of publications concerns the influence of various factors such as the translocation carrier status or sperm morphology on the results of sperm analysis with particular emphasis on the degree of DNA fragmentation and difficulties in interpreting the results of research concerning assisted reproduction methods.

The increased probability of detecting aberrations in a patient with reduced sperm count has been described by many authors. However, research usually does not focus on comparisons

with other parameters, and if they are being compared then it is with the parameters of sperm donors. In my study, I decided to use a different approach and compare translocation carriers to randomly selected men with normal karyotype. Carriers of reciprocal translocations and the control group did not differ significantly in terms of sperm concentration, motility and vitality. However, these parameters were the lowest in the group of Robertsonian translocation carriers. I did not find significant differences in the level of DNA fragmentation among the groups.

After a thorough review of the literature on the methods of assisted reproduction and on the basis of my own research, I cannot reach unequivocal conclusions. Some of the doubts related to the discrepancy in research results may be due to the lack of understanding of the basic optics principles. Authors of scientific publications should be obliged to provide the parameters necessary to calculate the real magnification of the microscope and the obtained resolution used during the sperm selection procedure before the fertilization procedure. This will eliminate at least some of the doubts related to the discrepancy in the test results.

Clinical significance of sperm morphology is still debatable, and some studies show that accurate measurement of morphological parameters plays a very important role in assessing male fertility. The purpose of my next study was to investigate the relationship between the presence of vacuoles in sperm and DNA damage. The results of this study show that correct morphology and lower number of vacuoles was associated with the lower degree of DNA fragmentation. However, even sperm cells in MSOME class I were not free from DNA damage. Techniques for assessing sperm morphology of spermatozoa organelles in real time are not sufficient for optimal selection of sperm, however, they can significantly reduce the risk of selecting a damaged sperm.

This research is an individual contribution to the development of scientific and practical knowledge about male infertility associated with sperm DNA fragmentation. The conclusions from the results of my studies verified the hypotheses from the scientific literature and drew attention to methodical problems that prevent reliable and unambiguous interpretation of the results presented so far.

## 10. Bibliografia

- [1] M. Vander Borgh and C. Wyns, “Fertility and infertility: Definition and epidemiology”, *Clinical Biochemistry*, pii: S0009-9120(18)30220-0, 2018.
- [2] A. Agarwal, A. Mulgund, A. Hamada and M. R. Chyatte, “A unique view on male infertility around the globe”, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 13, p. 37, 2015.
- [3] F. Zegers-Hochschild, K.G. Nygren, G.D. Adamson, J. de Mouzon, P. Lancaster, R. Mansour, E. Sullivan, “The International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) glossary on ART terminology”, *Fertil. Steril.*, vol. 86, no. 1, pp. 16–19, 2006.
- [4] L. Bablok, W. Dziadecki, I. Szymusik, S. Wolczynski, R. Kurzawa, L. Pawelczyk, P. Jedrzejczak, W. Hanke, P. Kaminski, M. Wielgos, “Patterns of infertility in Poland - multicenter study”, *Neuro Endocrinol. Lett.*, vol. 32, no. 6, pp. 799–804, 2011.
- [5] World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen FIFTH EDITION*, WHO, 2010.
- [6] C. Krausz, “Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis”, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 2, pp. 271–285, 2011.
- [7] A. Agarwal and S.S.R. Allamaneni, “Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come”, *Fertil. Steril.*, vol. 84, no. 4, pp. 850–853, 2005.
- [8] A. Jungwirth, T. Diemer, G.R. Dohle, Z. Kopa, C. Krausz and H. Tournaye, *EAU Guidelines on Male Infertility*, European Association of Urology, 2016.
- [9] S. Brugo-Olmedo, C. Chillik, and S. Kopelman, “Definition and causes of infertility.” *Reprod. Biomed. Online*, vol. 2, no. 1, pp. 41–53, 2001.
- [10] S. Kliesch, “Diagnosis of Male Infertility: Diagnostic Work-up of the Infertile Man”, *Eur. Urol. Suppl.*, vol. 13, no. 4, pp. 73–82, 2014.
- [11] K. Makker, A. Agarwal and R. Sharma, “Oxidative stress & male infertility”, *Indian J. Med. Res.*, vol. 129, no. 4, pp. 357–367, 2009.
- [12] A. Ferlin, F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka and C. Foresta, “Male infertility: role of genetic background”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 14, no. 6, pp. 734–45, 2007.
- [13] D.S. Irvine, “Epidemiology and aetiology of male infertility”, *Hum. Reprod.*, vol. 13, no. suppl 1, pp. 33–44, 1998.
- [14] C. Siristatidis and S. Bhattacharya, “Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter?”, *Hum. Reprod.*, vol. 22, no. 8, pp. 2084–2087, 2007.

- [15] J. H. Check, H. G. Adelson, B. R. Schubert and A. Bollendorf, “Evaluation of sperm morphology using Kruger’s strict criteria.”, *Arch. Androl.*, vol. 28, no. 1, pp. 15–17.
- [16] A. Zini, “Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic?”, *Syst. Biol. Reprod. Med.*, vol. 57, no. 1–2, pp. 78–85, 2011.
- [17] A. Zini and A. Agarwal, *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*, Springer, New York, 2011.
- [18] G. Fuentes-Mascorro, H. Serrano, A. Rosado, T. F. Wu and D. S. Chu, *Sperm Chromatin*, Springer, New York, 2011.
- [19] C. González-Marín, J. Gosálvez and R. Roy, “Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 11, pp. 14026–14052, 2012.
- [20] R. Henkel, M. Hajimohammad, T. Stalf, C. Hoogendijk, C. Mehnert, R. Menkveld H. Gips, W.B. Schill, T.F. Kruger, “Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy”, *Fertil. Steril.*, vol. 81, no. 4, pp. 965–972, 2004.
- [21] R. Henkel, E. Kierspel, M. Hajimohammad, T. Stalf, C. Hoogendijk, C. Mehnert, R. Menkveld, W.B. Schill and T.F. Kruger, “DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 7, no. 4, pp. 477–484.
- [22] A. Ahmadi and S.C. Ng, “Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa.”, *J. Exp. Zool.*, vol. 284, no. 6, pp. 696–704, 1999.
- [23] L. Simon, K. Murphy, M.B. Shamsi, L. Liu, B. Emery, K.I. Aston, J. Hotaling, D.T. Carrell, “Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development”, *Hum. Reprod.*, vol. 29, no. 8, pp. 2402–2412, 2014.
- [24] L. Simon, A. Zini, A. Dyachenko, A. Ciampi and D. Carrell, “A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on IVF and ICSI outcome”, *Asian J. Androl.*, vol. 19, no. 1, p. 80-90, 2016.
- [25] A.N. Fatehi, M.M. Bevers, E. Schoevers, B.A.J. Roelen, B. Colenbrander and B.M. Gadella, “DNA Damage in Bovine Sperm Does Not Block Fertilization and Early Embryonic Development But Induces Apoptosis After the First Cleavages”, *J. Androl.*, vol. 27, no. 2, pp. 176–188, 2006.
- [26] M.-H. Lin, R. Kuo-Kuang Lee, S.-H. Li, C.-H. Lu, F.-J. Sun and Y.-M. Hwu, “Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates”, *Fertil. Steril.*, vol. 90, no. 2, pp. 352–359, 2008.

- [27] A. Agarwal, S. Prabakaran and S. S. Allamaneni, “Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 12, no. 5, pp. 630–633, 2006.
- [28] L. Tamburrino, S. Marchiani, M. Montoya, F. Elia Marino, I. Natali, M. Cambi, G. Forti, E. Baldi and M. Muratori, “Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage”, *Asian J. Androl.*, vol. 14, no. 1, pp. 24–31, 2012.
- [29] A. Agarwal and T. M. Said, “Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach”, *BJU Int.*, vol. 95, no. 4, pp. 503–507, 2005.
- [30] D. Sakkas and J. G. Alvarez, “Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis”, *Fertil. Steril.*, vol. 93, no. 4, pp. 1027–1036, 2010.
- [31] J. Rubes, S.G. Selevan, D.P. Evenson, D. Zudova, M. Vozdova, Z. Zudova, W.A. Robbins, S.D. Perreault, “Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality”, *Hum. Reprod.*, vol. 20, no. 10, pp. 2776–2783, 2005.
- [32] M. Enciso, L. Muriel, J.L. Fernández, V. Goyanes, E. Segrelles, M. Marcos, J.M. Montejo, M. Ardoy, A. Pacheco, J. Gosálvez, “Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test”, *J. Androl.*, vol. 27, no. 1, pp. 106–111, 2006.
- [33] A. Harlev, A. Agarwal, S.O. Gunes, A. Shetty and S.S. du Plessis, “Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review.”, *World J. Mens. Health*, vol. 33, no. 3, pp. 143–160, 2015.
- [34] A.R. Collins, “The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations”, *Mol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 3, pp. 249–261, 2004.
- [35] K. Oleszczuk, A. Giwercman and M. Bungum, “Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome”, *Andrology*, vol. 4, no. 2, pp. 290–296, 2016.
- [36] L. Simon, G. Brunborg, M. Stevenson, D. Lutton, J. McManus and S.E. Lewis, “Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome”, *Hum. Reprod.*, vol. 25, no. 7, pp. 1594–1608, 2010.
- [37] D. P. Evenson and R. Wixon, “Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay–derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome”, *Fertil. Steril.*, vol. 90, no. 4, pp. 1229–1231, 2008.
- [38] D.P. Evenson, L.K. Jost, D. Marshall, M.J. Zinaman, E. Clegg, K. Purvis, P. de Angelis

- and O.P. Claussen, “Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic”, *Hum.Reprod.*, vol. 14, no. 4, pp. 1039-1049, 1999.
- [39] M. Spanò, J. P. Bonde, H. I. Hjöllund, H. A. Kolstad, E. Cordelli and G. Leter, “Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team”, *Fertil. Steril.*, vol. 73, no. 1, pp. 43–50, 2000.
- [40] G.M. Buck Louis, R. Sundaram, E.F. Schisterman, A. Sweeney, C.D. Lynch, S. Kim, J.M. Maisog, R. Gore-Langton, M.L. Eisenberg and Z Chen, “Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study”, *Fertil. Steril.*, vol. 101, no. 2, pp. 453–462, 2014.
- [41] A. Zini, “Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic?”, *Syst. Biol. Reprod. Med.*, vol. 57, no. 1–2, pp. 78–85, 2011.
- [42] E. H. Duran, M. Morshedi, S. Taylor and S. Oehninger, “Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study”, *Hum. Reprod.*, vol. 17, no. 12, pp. 3122–3128, 2002.
- [43] M. Bungum, P. Humaidan, A. Axmon, M. Spano, L. Bungum, J. Erenpreiss, Giwercman A, “Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome”, *Hum. Reprod.*, vol. 22, no. 1, pp. 174–179, 2007.
- [44] N. Frydman, N. Prisant, L. Hesters, R. Frydman, G. Tachdjian, P. Cohen-Bacrie and R. Fanchin, “Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation”, *Fertil. Steril.*, vol. 89, no. 1, pp. 92–97, 2008.
- [45] R. Henkel, E. Kierspel, M. Hajimohammad, T. Stalf, C. Hoogendijk, C. Mehnert, R. Menkveld, W.B. Schill and T.F. Kruger, “DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 7, no. 4, pp. 477–484, 2003.
- [46] E. Høst, S. Lindenberg and S. Smidt-Jensen, “The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI”, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, vol. 79, no. 7, pp. 559–563, 2000.
- [47] L. Simon, J. Castillo, R. Oliva and S. E. M. Lewis, “Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 23, no. 6, pp. 724–734, 2011.
- [48] L. Simon, D. Lutton, J. McManus and S. E. M. Lewis, “Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro

- fertilization success”, *Fertil. Steril.*, vol. 95, no. 2, pp. 652–657, 2011.
- [49] L. Simon, I. Proutski, M. Stevenson, D. Jennings, J. McManus, D. Lutton and S.E. Lewis, “Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 26, no. 1, pp. 68–78, 2013.
- [50] J. A. Collins, K. T. Barnhart and P. N. Schlegel, “Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?”, *Fertil. Steril.*, vol. 89, no. 4, pp. 823–831, 2008.
- [51] M. Benchaib, J. Lornage, C. Mazoyer, H. Lejeune, B. Salle and J. Francoisguerin, “Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome”, *Fertil. Steril.*, vol. 87, no. 1, pp. 93–100, 2007.
- [52] A. Borini, N. Tarozzi, D. Bizzaro, M.A. Bonu, L. Fava, C. Flamigni, G. Coticchio, “Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART”, *Hum. Reprod.*, vol. 21, no. 11, pp. 2876–2881, 2006.
- [53] M. H. Lin, R. Kuo-Kuang Lee, S. H. Li, C. H. Lu, F. J. Sun and Y. M. Hwu, “Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates”, *Fertil. Steril.*, vol. 90, no. 2, pp. 352–359, 2008.
- [54] Z. Li, L. Wang, J. Cai and H. Huang, “Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis”, *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 23, no. 9–10, pp. 367–376, 2006.
- [55] B. Ozmen, G. S. Caglar, F. Koster, B. Schopper, K. Diedrich and S. Al-Hasani, “Relationship between sperm DNA damage, induced acrosome reaction and viability in ICSI patients”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 15, no. 2, pp. 208–214, 2007.
- [56] L. Simon, A. Zini, A. Dyachenko, A. Ciampi and D. T. Carrell, “A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome”, *Asian J. Androl.*, vol. 19, no. 1, pp. 80–90, 2016.
- [57] A. Osman, H. Alsomait, S. Seshadri, T. El-Toukhy and Y. Khalaf, “The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 30, no. 2, pp. 120–127, 2015.
- [58] L. Gandini, F. Lombardo, D. Paoli, F. Caruso, P. Eleuteri, G. Leter, R. Ciriminna, F. Culasso, F. Dondero, A. Lenzi and M. Spanò, “Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage”, *Hum. Reprod.*, vol. 19, no. 6, pp. 1409–1417, 2004.



- [59] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, “Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion” *Fertil. Steril.*, vol. 98, no. 2, pp. 294–301, 2012.
- [60] J.Jarow, M.Sigman, P.N. Kolettis, L.R. Lipshultz, R.D. McClure, A.K. Nangia, C.K. Naughton, G.S. Prins, J.I. Sandlow and P.N. Schlegel, “The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement”, *American Urological Association Education and Research*, 2010.
- [61] W. Gorczyca, F. Traganos, H. Jesionowska and Z. Darzynkiewicz, “Presence of DNA Strand Breaks and Increased Sensitivity of DNA in Situ to Denaturation in Abnormal Human Sperm Cells: Analogy to Apoptosis of Somatic Cells”, *Exp. Cell Res.*, vol. 207, no. 1, pp. 202–205, 1993.
- [62] M. Cissen, M.V. Wely, I. Scholten, S. Mansell, J.P. Bruin, B.W. Mol, D. Braat, S. Repping and G. Hamer, “Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *PLoS One*, vol. 11, no. 11, p. e0165125, 2016.
- [63] O. Ostling and K.J. Johanson, “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 123, no. 1, pp. 291–298, 1984.
- [64] L. Simon and D.T. Carrell, “Sperm DNA damage measured by comet assay.”, *Methods Mol Biol.*; vol 927, pp. 137-146, 2013.
- [65] N. Tarozzi, D. Bizzaro, C. Flamigni, and A. Borini, “Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 14, no. 6, pp. 746–757, 2007.
- [66] A. Agarwal, A. Majzoub, S. C. Esteves, E. Ko, R. Ramasamy and A. Zini, “Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios”, *Transl. Androl. Urol.*, vol. 5, no. 6, pp. 935–950, 2016.
- [67] M.H. Johnson, “Robert Edwards: the path to IVF”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 23, no. 2, pp. 245–262, 2011.
- [68] G. Pincus and B. Saunders, “The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. VI. The maturation of human ovarian ova”, *Anat. Rec.*, vol. 75, no. 4, pp. 537–545, 1939.
- [69] R.G. Edwards, “The bumpy road to human in vitro fertilization.”, *Nat. Med.*, vol. 7, no. 10, pp. 1091–1094, 2001.
- [70] B.D. Bavister, “Environmental factors important for in vitro fertilization in the

- hamster.”, *J. Reprod. Fertil.*, vol. 18, no. 3, pp. 544–545, 1969.
- [71] R.G. Edwards, B.D. Bavister, and P.C. Steptoe, “Did Fertilization Occur?”, *Nature*, vol. 221, no. 5184, pp. 981–982, 1969.
- [72] E. M. Kratz and M. K. Achcińska, “Molecular mechanisms of fertilization: the role of male factor”, *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, vol. 65, pp. 784–795, 2011.
- [73] R.G. Edwards, P.C. Steptoe and J.M. Purdy, “Fertilization and Cleavage in vitro of Preovulator Human Oocytes”, *Nature*, vol. 227, no. 5265, pp. 1307–1309, 1970.
- [74] S.A. Beall and A. DeCherney, “History and challenges surrounding ovarian stimulation in the treatment of infertility”, *Fertil. Steril.*, vol. 97, no. 4, pp. 795–801, 2012.
- [75] G. Palermo, H. Joris, P. Devroey, and A.C. Van Steirteghem, “Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte”, *Lancet (London, England)*, vol. 340, no. 8810, pp. 17–18, 1992.
- [76] B. Bartoov, A. Berkovitz, F. Eltes, A. Kogosowski, Y. Menezo, and Y. Barak, “Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome”, *J. Androl.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–8, 2002.
- [77] F. Celep, A. Karagüzel, M. Özeren, and H. Bozkaya, “The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure”, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 127, no. 1, pp. 106–109, 2006.
- [78] R. Flannigan and P.N. Schlegel, “Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice”, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 44, pp. 26–37, 2017.
- [79] G.L. Harton and H.G. Tempest, “Chromosomal disorders and male infertility”, *Asian J. Androl.*, vol. 14, no. 1, pp. 32–39, 2012.
- [80] R.H. Martin, “Cytogenetic determinants of male fertility”, *Hum. Reprod. Update*, vol. 14, no. 4, pp. 379–390, 2008.
- [81] P.A. Koşar, N. Özçelik, and A. Koşar, “Cytogenetic abnormalities detected in patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia”, *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 27, no. 1, pp. 17–21, 2010.
- [82] M. Olszewska, M. Fraczek, N. Huleyuk, A. Czernikiewicz, E. Wiland, M. Boksa, D. Zastavna, B. Panasiuk, A.T. Midro and M. Kurpisz, “Chromatin structure analysis of spermatozoa from reciprocal chromosome translocation (RCT) carriers with known meiotic segregation patterns”, *Reprod. Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 209–220, 2013.
- [83] F. Brugnon, L. Janny, Y. Communal, C. Darcha, C. Szczepaniak, F. Pellestor, P. Vago, H. Pons-Rejraji, C. Artonne and G. Grizard, “Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients”, *Hum. Reprod.*,

- vol. 25, no. 7, pp. 1631–1642, 2010.
- [84] A. Perrin, E. Caer, M. Oliver-Bonet, J. Navarro, J. Benet, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel, “DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality”, *Fertil. Steril.*, vol. 92, no. 2, pp. 583–589, 2009.
- [85] A. Perrin, A. Basinko, N. Douet-Guilbert, N. Gueganic, M.J. Le Bris, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel, “Aneuploidy and DNA Fragmentation in Sperm of Carriers of a Constitutional Chromosomal Abnormality”, *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 133, no. 2–4, pp. 100–106, 2011.
- [86] International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature, *ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature (2016)*, Reprint of: Cytogenetic and Genome Research vol. 149, no. 1-2, 2016.
- [87] D.B. Murphy and M.W. Davidson, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*, Wiley-Blackwell, 2013.
- [88] M. Pluta, *Mikroskopia optyczna*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1982.
- [89] L. Simon, A. Wilcox, and D.T. Carrell, “Intracytoplasmic morphology-selected sperm injection”, *Methods Mol. Biol.*, vol. 927, pp. 247–256, 2013.
- [90] B. Bartoov, A. Berkovitz, F. Eltes, A. Kogosovsky, A. Yagoda, H. Lederman, S. Artzi, M. Gross and Y. Barak, “Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection”, *Fertil. Steril.*, vol. 80, no. 6, pp. 1413–1419, 2003.
- [91] A. Berkovitz, F. Eltes, S. Yaari, N. Katz, I. Barr, A. Fishman and B. Bartoov, “The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm”, *Hum. Reprod.*, vol. 20, no. 1, pp. 185–190, 2005.
- [92] I. Hammoud, F. Boitrelle, F. Ferfourri, F. Vialard, M. Bergere, B. Wainer, M. Bailly, M. Albert and J. Selva, “Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates”, *Andrologia*, vol. 45, no. 3, pp. 163–170, 2013.
- [93] F. Boitrelle, F. Ferfourri, J.M. Petit, D. Segretain, C. Tourain, M. Bergere, M. Bailly, F. Vialard, M. Albert and J. Selva., “Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation”, *Hum. Reprod.*, vol. 26, no. 7, pp. 1650–1658, 2011.

- [94] N.G. Cassuto, A. Hazout, I. Hammoud, R. Balet, D. Bouret, Y. Barak, S. Jellad, J.M. Plouchart, J. Selva, C and Yazbeck. “Correlation between DNA defect and sperm-head morphology”, *Reprod. Biomed. Online*, vol. 24, no. 2, pp. 211–218, 2012.
- [95] J.G. Franco, A.L. Mauri, C.G. Petersen, F.C. Massaro, L.F. Silva, V. Felipe, M. Cavagna, A. Pontes, R.L. Baruffi, J.B. Oliveira and L.D. Vagnini., “Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa”, *Int. J. Androl.*, vol. 35, no. 1, pp. 46–51, 2012.

## 11. Prace będące przedmiotem rozprawy

E. Pastuszek, J. Kiewisz, P.M. Kulwikowska, M. Lukaszuk, K. Lukaszuk; **Sperm parameters and DNA fragmentation of balanced chromosomal rearrangements carriers;** Folia Histochemica et Cytobiologica. 2015;53(4):314-321. doi:10.5603/fhc.a2015.0032 (praca oryginalna)

[https://journals.viamedica.pl/folia\\_histochemica\\_cytobiologica/article/view/fhc.a2015.0032/30641](https://journals.viamedica.pl/folia_histochemica_cytobiologica/article/view/fhc.a2015.0032/30641)

K. Lukaszuk, E. Pastuszek, A. Samojedny; **Comment on: "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures" by Gatimel et al.,** Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2016;33(9):1253-12534. doi: 10.1007/s10815-016-0746-9 (list do redakcji)

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10815-016-0746-9.pdf>

E. Pastuszek, J. Kiewisz, P. Skowronska, J. Liss, M. Lukaszuk, A. Bruszczyńska, G. Jakiel, K. Lukaszuk; **An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human sperm on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay;** Andrology. 2017;5(2):392-398. doi: 10.1111/andr.12324 (praca oryginalna)

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/andr.12324>