

OTDK-dolgozat

2025

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET

**Spermiumok DNS-fragmentáció meghatározása, mint az asszisztált
reprodukciós kivizsgálás új iránya**

37. OTDK Biológia Szekció

Készítette: Honétzy Natália

Biológus MSc hallgató I. évfolyam

Témavezetők: Dr. Máté Gábor, Dr. Czétány Péter



2025.01.08.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1 Infertilitás.....	3
1.2. Ismeretlen eredetű meddőség	5
1.3. Férfi meddőség	6
1.4. DNS-fragmentáció.....	9
1.5. DNS-fragmentáció-visszatérő vetélés.....	10
2. Célkitűzések	13
3. Anyag és módszer	14
3.1. Mintagyűjtés, funkcionális paraméterek meghatározása	14
3.2. Spermiumfeldolgozási technikák	15
3.2.1. Sűrűség-gradiens centrifugálás	15
3.2.2. Swim-up	15
3.2.3. Mágneses-sejtszeparálás (MACS)	15
3.2.4. CHIP-technológia	16
3.3. Sperm chromatin structure assay (SCSA) teszt	16
3.4. Statisztikai kiértékelés.....	16
4. Eredmények	18
4.1. DNS-fragmentáció hatása a spermiumok funkcionális paramétereire	18
4.2. DNS-fragmentáció teljes ejakulátum vs. élő sejtek	19
4.3. DNS-fragmentáció az egyes feldolgozási technikákat követően.....	19
5. Következtetések.....	21
5.1. DNS-fragmentáció hatása a spermium funkcionális paramétereire	21
5.2. Különböző spermium feldolgozási technikák hatása a vitalitásra, motilitásra, DNS-fragmentációra	22
5.3. Élő spermiumok szelekciójának hatása a DNS-fragmentációra	24
6. Irodalomjegyzék	26
7. Köszönetnyilvánítás	38
8. Oldatok, vegyszerek	39

1. Bevezetés

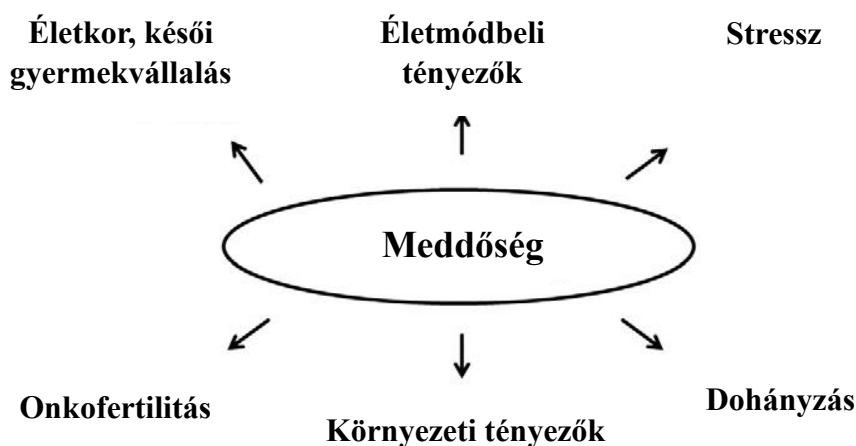
1.1 Infertilitás

A meddőség jelentős egészségügyi probléma, amely sok párt érint. Fogalma úgy határozható meg, mint 12 hónapon át tartó, rendszeres, védekezés nélküli nemi közösülést követő sikertelen teherbeesés (Brugo-Olmedo et al., 2001). Meddő párok esetében körülbelül 85%-ban azonosíthatóak az okok, azonban a fennmaradó 15 %-ban ismeretlenek (Makar & Toth, 2002). A leggyakoribb okok közé tartozik a teljesség igénye nélkül az ovulációs diszfunkció, az endometriózis, az emelkedő anyai életkor, a férfi meddőséget okozó tényezők, valamint a petevezeték érintő problémák. Környezeti és életmódbeli tényezők, mint a táplálkozás, stressz, toxikus anyagoknak való kitettség mind károsan befolyásolhatják a termékenységet (Carson & Kallen, 2021). Az ovulációs rendellenességek a meddőségi diagnózisok körülbelül 25%-át teszik ki. Az anovulációban szenvedő nők 70%-a policisztás- petefészek szindrómában szenved (polycystic ovary syndrome, PCOS). A meddőség a terméketlenséggel összefüggő krónikus alapbetegség markere is lehet (Brugo-Olmedo et al., 2001). A reprodukív egészség területén a meddőség olyan hiányosságot jelent, amely nem veszélyezteti az egyén testi épségét, és nem is életveszélyes, azonban negatívan befolyásolhatja az egyén fejlődését, frusztrációt okozhat és rossz hatással lehet a mentális egészségre, mivel a legtöbb pár létfontosságú célnak tekinti a gyermekvállalást (Hassan & Killick, 2004). Az előfordulási gyakoriságban jelentős földrajzi különbségek figyelhetők meg, és ezeket a különbségeket nagyrészt a különböző környezeti, kulturális és társadalmi-gazdasági hatások magyarázzák (Ombelet et al., 2008b). Az 1950-es évek eleje óta a demográfiai felmérések a születési ráta folyamatos csökkenését mutatják minden európai országban, a régiók és a társadalmi osztályok közötti nem szignifikáns eltérésekkel. A magas jövedelmű országokban a lakosság körülbelül 15%-át érinti a meddőség (Healy et al., 1994), és ez az arány még magasabb az alacsony jövedelmű országokban (előfordulása 9–30%) (Carson & Kallen, 2021). Ez arra világít rá, hogy az egészségesebb életmódot ösztönző, valamint a szexuális úton terjedő betegségek terjedésének csökkentését célzó programok tervezése és végrehajtása a meddőségi ráta csökkenését okozná, éppen emiatt lenne fontos, hogy a kutatások fókuszában álljon (Adler, 1996).

A termékenység fokozatosan csökken az életkor előrehaladtával, és a nők esetében 35 éves kor után rohamosan esik. A legtöbb kutatás azt mutatja, hogy 41 éves korukra a legtöbb nő terméketlenné válik (Petraglia et al., 2013). A termékenység fokozatos csökkenése az anyai életkorral a spontán vetélések és a magzati genetikai rendellenességek fokozatos növekedésével jár együtt, ez utóbbi pedig nagy valószínűséggel a petesejtek számának és minőségének fokozatos csökkenésével függ össze (Homan et al., 2007). A késői gyermekvállalás a társadalmi szokások mélyreható változásának eredménye, különösen a magas jövedelmű országokban (Ombelet et al., 2008b). A nők életkorának előrehaladtával a meddőséghez kapcsolódó leggyakoribb tényezők a másodlagos amenorrhoea, a PCOS, a méhben levő myomák és az endometriózis. A másodlagos hypothalamus amenorrhoea az agyalapi mirigy felé irányuló hypothalamus jelek diszfunkciója (Evers, 2002). A diszfunkció gyakran összefügg a krónikus stresszel, ami a gonadotropin szekréciót a prepubertás lányoknál tapasztalt szinthez hasonló szintre csökkenti (Giles & Berga, 1993). A fizikai, metabolikus és pszichológiai stresszorok fiziológiai alkalmazkodást igényelnek, valamint, ha nem megfelelő a kezelés, abban az esetben a betegség okozójává is válhatnak (Hassan & Killick, 2004). Tudományosan bizonyított, hogy a dohányzásnak számos káros hatása van a termékenységre. Károsan befolyásolja mind a férfi, mind a női termékenységet (Hassan & Killick, 2004). Emellett több kutatás is zajlott annak érdekében, hogy kiderítsék a koffein befolyásolja-e az esélyeket a

teherbeeséshez. Az eredmények azt mutatták, hogy a koffein befolyásolhatja a női reprodukciót azáltal, hogy megváltoztatja az ovulációt és a sárgatest működését okozó hormonok szintjét. Több kutatás is alátámasztotta, hogy összefüggés van a magas koffeinfogyasztás és a terhesség csökkenésének esélye között (Hassan & Killick, 2003). Az alkohol hatását is vizsgálták, mely ismert teratogén. Beszámoltak arról, hogy csökkenti a termékenységet, bár a kockázathoz kapcsolódó fogyasztás mértéke még nem tisztázott. Vitatottak azok a mechanizmusok, amelyek révén az alkohol károsíthatja a fogantatást, de ezek közé tartozik az alkohol által kiváltott ösztrogénszint-emelkedés, ami csökkenti az follikulus stimuláló hormon szekréciót, elnyomja a follikulogenezist és az ovulációt. Közvetlen hatással lehet a petesejtekérésére, ovulációjára, blasztociszta fejlődésére és beágyazódására (Petraglia et al., 2013). További káros tényező lehet a különböző sugárzás, amivel találkozunk az ember nap, mint nap. Kutatások kimutatták, hogy a férfi és női reproduktív rendszer érzékeny a sugárzásra, amely a kapott dózistól, a sugárzás típusától (ionizáló/nem ionizáló) és az expozíció időtartamától függően átmeneti vagy tartós meddőséget okozhat (Makar & Toth, 2002).

A meddőség jelentős társadalmi-gazdasági jelentőségű probléma, amelynek számos szervi oka van, és amely megelőzéssel, diagnózissal és korai kezeléssel kezelhető (Ombelet et al., 2008b). A meddőség olyan állapot, amely a reproduktív korban lévő párok egyötödét-hatodát érinti. Ahhoz, hogy a meddőség okait kiderítsék, mind a két fél vizsgálata szükséges (Makar & Toth, 2002). Mind a női, mind a férfi meddőség vizsgálatát nagymértékben befolyásolta a molekuláris biológia és a genetika fejlődése. Ez a két tudományág kulcsfontosságú a meddő párok tanulmányozása, diagnosztizálása és a megfelelő kezelések megtalálása szempontjából (Hassan & Killick, 2003).



1. ábra: A meddőség kockázati tényezői (Forrás: (Carson & Kallen, 2021))

1.2. Ismeretlen eredetű meddőség

Az ismeretlen eredetű meddőség diagnózisát csak a meddőség gyakori okainak kizárását követően lehet megállapítani (Zegers-Hochschild et al., 2009). Ehhez standard termékenységi vizsgálatokat alkalmaznak, amely során sperma analízist végeznek, normál ovulációs funkciót (alaptesthőmérséklet, luteinizáló hormon (LH) szérumszint emelkedése, progeszteronszint luteális fázisban), valamint a petevezetékek átjárhatóságát vizsgálják (Crosignani et al., 1993). Azért esett ezekre a tesztekre a választás, mint standard termékenységi vizsgálatok, mert határozott korrelációt mutatnak a terhességgel. Abban az esetben, ha ezek közül egyik okot sem tudják azonosítani, mint a meddőség lehetséges oka, akkor ismeretlen eredetű meddőséggént diagnosztizálják (D. S. Guzick et al., 1994; Smith, 2003). Általánosságban ez a női meddőség közel 40%-áért és a párok 8-28%-áért felelős (Thonneau et al., 1991). Az ismeretlen eredetű meddőség előfordulásának gyakorisága a vizsgált populáció életkorától és kiválasztási kritériumaitól függően változik (Aboulghar et al., 2003). A sperma analízis az Egészségügyi Világszervezet (WHO) kézikönyvében megadott alsó referenciahatárok (5. percentilis 95%-os konfidencia intervallumokkal) alapján történik, melyek a következők: a spermiumkoncentráció 16 M/ml, motilitás 42% (38%-42%), progresszív motilitás 30% (31%-34%), vitalitás 54% (55%-63%), normál morfológiája 4% (3%-4%), DNS-fragmentáció (DF) pedig maximum 25-30% (Jensen et al., 2001). A párok mintegy 20%-nál a meddőség egyetlen oka a spermiumok funkcionális paramétereinél levő probléma, valamint további 25%-ban hozzájárul a meddőség kialakulásához egyéb tényezőkkel együtt (Hull et al., 1985). A peteérés zavarai a meddő párok körülbelül 21-25%-át érintik (Zegers-Hochschild et al., 2009).

A WHO az ovulációs rendellenességeket 3 csoportba sorolja. Az első ilyen csoport a hipotalamusz-hipofízis elégtelenségből eredő ovulációs zavarok, melyek az ovulációs rendellenességek körülbelül 10%-át teszik ki. A második csoport a hipotalamusz-hipofízis petefészek tengely diszfunkciója miatt kialakuló ovulációs problémák, beleértve a PCOS-t és a hiperprolaktinémiás amenorrhéát (Gelbaya et al., 2014). Az ovulációs zavarokban szenvedő nők körülbelül 85%-a tartozik ebbe a kategóriába. A harmadik csoport pedig a petefészek-elégtelenség okozta ovulációs rendellenességek, ezek az ovulációs zavarokkal küzdő nők 5%-át érintik (Smith, 2003). A standard termékenységi vizsgálatokat követően a negatív eredmény nem minden esetben egyenlő azzal, hogy nincsen feltárható oka a meddőségnek. Sok esetben nehezen kimutatható okok rejtőznek emögött (Evers et al., 1998). Ilyen például a nők esetében az endometriózis. Diagnosztizálása nehéz lehet, különösen atípusos elváltozások esetén. Sok esetben az ismeretlen meddőség oka lehet a nem diagnosztizált endometriózis (Giudice & Kao, 2004). Egy közelmúltbeli tanulmányban az ismeretlen eredetű meddőséggel diagnosztizált nőknél végzett diagnosztikai laparoszkópia az esetek 15%-ában endometriózist mutatott ki (Gelbaya et al., 2014).

A reprodukciós rendszer teljeskörű értékeléséhez még messze nincs elég ismeret, mivel számos, felmérés vagy funkció vizsgálata nem került még a kutatás középpontjába, ezáltal ezekről kevesebbet tudunk, beleértve a méhnyak nyálkahártyáját, a kapacitációt, vagy a spermiumoknak a méh-cső csomóponton való áthaladásának képességét (Abdelazim et al., 2018). A meddőség egyik fontos tényezője lehet a hibás petesejt, különösen az idősebb pácienseknél, azonban ez egy olyan probléma, melyet nehéz felmérni. Emellett jelenleg nem állnak rendelkezésre olyan tesztek, amelyekkel a sikeres beágyazódás esélyét lehetne megállapítani (Smith, 2003). A Royal College of Obstetricians and Gynecologists iránymutatása szerint, az ismeretlen meddőségben szenvedő pároknak meg kell próbálniuk a várandós kezelést az asszisztált reprodukív kezelés (assisted reproductive techniques, ART)

előtt (D. Guzick et al., 1998). Egy ilyen terhesség esélye elsősorban a páciens korától, a meddőség fennállásának időtartamától, valamint ugyanabban a párkapcsolatban lévő korábbi terhességek előfordulásától függ (Ray et al., 2012a). A spontán terhesség esélye a várandós kezelés mellett alacsony, de soha nem nulla. Egy kutatás során arra a következtetésre jutottak, hogy az empirikus klomifén-citrát és a méhen belüli megtermékenyítés (intrauterine insemination, IUI) nem kínál jobb élveszületési arányt a kontroll populációhoz képest ismeretlen eredetű meddőség esetén (Wordsworth et al., 2011). A petevezeték átöblítése bizonyítottan növeli a terhesség esélyét ismeretlen eredetű meddőség esetén, valamint az endometriózis korai stádiumában. egy tanulmány során kimutatták, hogy a lipiodol-os petevezeték-öblítéssel kezelt meddő párok terhességi aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a kezelés nélküli csoportban (Nugent et al., 2002). Azt feltételezték, hogy az olajos-alapú petevezeték-öblítés utáni megnövekedett terhességi arány a petevezetékben lévő törmelék eltávolításával áll összefüggésben (Agić et al., 2006). Van egy hipotézis, mely szerint az ismeretlen eredetű meddőségben szenvedő párok esetén az IUI növeli a petesejtek számára elérhető mozgékony spermiumok sűrűségét, ezzel tovább növelve a teherbeesés esélyét is (Hughes et al., 2010). A korábbi vizsgálatok valóban jobb terhességi arányokat mutattak az IUI esetén, azonban a legújabb tanulmányok megkérdőjelezték ennek a hatását összehasonlítva 6 hónapon át tartó kezelés nélküli várakozással szemben (Steures et al., 2006). Mind a stimulált, mind a nem stimulált IUI hatékonyabb, mintha a páciens egyáltalán nem részesülne kezelésben, azonban egyes szakemberek szerint nem szabadna felajánlani opcióként a petefészek-stimulációt, annak ellenére, hogy a stimulált IUI magasabb terhességi arányt eredményez, mint a nem stimulált, mivel ikerterhesség magasabb kockázatával jár (Abdelazim et al., 2018). Az in vitro fertilizáció (IVF) és az intracitoplazmatikus spermium injekció (ICSI) drágák, invazívak, azonban a leghatékonyabb módjai a meddőség kezelésének (Sunkara et al., 2023).

Összességében elmondható, hogy az ismeretlen eredetű meddőség gyakori diagnózis, mely a meddő párok 30%-át érinti (Abdelazim et al., 2018). További kutatásra van szükség a meddőség egyéb lehetséges okainak feltárásához, mint például a petevezetékkel kapcsolatos szállítási problémák, ovulációs diszfunkció, az ivarsejtek minősége, a spermiumok diszfunkciója, az endometrium fogékonysága, a luteális fázis defektusa, végül pedig az endometriózis (Smith, 2003). Emellett pedig nincsen egyértelmű válasz arra a kérdésre, hogy mi lehet a legideálisabb kezelési módszer meddőségben szenvedő párok esetén (Ray et al., 2012b). Ahhoz, hogy az adott pár esetében a leghatékonyabb kezelési módszert alkalmazzák, elsősorban a beteg életkorát és a meddőség időtartamát kell figyelembe venni, emellett a rendelkezésre álló erőforrások figyelembevétele sem utolsó (Ray et al., 2012b). További kutatások kellenek annak érdekében is, hogy az eddig észrevehetetlen kisebb problémák is azonosíthatóak legyenek (Wang et al., 2020).

1.3. Férfi meddőség

Becslések szerint a meddőség világszerte a párok 8–12% -át érinti, körülbelül az esetek 50%-ában a férfi tényező elsődleges vagy hozzájáruló ok (Agarwal et al., 2021). A férfi szubfertilitásának több oka is lehet, azonban a legtöbb esetben ezek kevésbé ismertek, de összefüggésbe hozhatóak veleszületett, szerzett vagy idiopátiás tényezőkkel, amelyek negatív hatással vannak többek között a spermatogenezisre is (Jungwirth et al., 2012). Elsődlegesen a spermiumtermelés vagy funkció zavarával kapcsolatosak. Csökkent fertilitást jelezhet az

alacsony spermiumszám (oligozoospermia), a mozgékonyság csökkenése (asthenozoospermia), vagy pedig a rendellenes morfológia (teratozoospermia) (Schaeffer & Hotaling, 2016). Egyes férfiak esetében a spermium termeléssel nincs probléma, azonban az elzáródás miatt a spermiumok az ejakuláció során nem jutnak ki a húgycsőbe, ezáltal az ondóban nem találhatók meg (Alshahrani et al., 2016). Ezt obstruktív azoospermiának nevezzük, míg a nem obstruktív azoospermia esetén a spermiumok hiányának oka valószínűleg a herék rendellenes produkciójával van összefüggésben (Alshahrani et al., 2016). Ejakulációs problémák is felmerülhetnek, mint például a retrogád magömlés, korai magömlés, vagy anejakuláció (magömlés hiánya). Ezek előfordulhatnak akár spermiumszám-, mozgásképeségi vagy egyéb rendellenességek nélkül is (Jungwirth et al., 2012). A hipogonadizmus is befolyásolhatja a spermatogenezist. Ennek oka lehet a tesztoszteronszint csökkenése, amely elsődleges hereelégtelenség (hipergonadotropikus) vagy másodlagos hipogonadizmus (hipogonadotropikus) következménye. Akkor alakul ki, amikor a hypothalamus gonadotropin-releasing hormonjának vagy az agyalapi mirigy gonadotropin szekréciójának szintje nem megfelelő (Pellati et al., 2008).

Az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kapott a meddőség genetikai háttere. A férfi meddőség ismert genetikai okai a cisztás fibrózis génmutációival összefüggő kétoldali vas deferens hiánya, a Kallmann-szindróma, a herefunkció romlásához vezető kromoszóma-rendellenességek, valamint az izolált spermatogén defektusokat eredményező Y kromoszóma mikrodélációk (Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Gyakoriak a transzlokációk is, egy tanulmányban kimutatták, hogy a kromoszómális transzlokációk előfordulási gyakorisága meddő férfiaknál 2,1% (Asero et al., 2014), mely a fertilis populációhoz képest magasabb előfordulást jelez. A transzlokációk több típusát is leírták már, ilyen a Robertson-féle és a reciprok transzlokáció, amelyek a férfi meddőség okainak 10%-át teszik ki (Hwang et al., 2021). A Robertson-féle transzlokációk főleg az acrocentrikus kromoszómákra jellemzőek. Ezek hordozói fenotípusosan normálisak lehetnek, azonban reprodukív diszfunkciót mutathatnak, mint például az oligozoospermia (A. Sharma et al., 2021). Ma már nyilvánvaló, hogy a meddőség genetikai etiológiája a spermatogenezis zavarának egyik fontos tényezője (Asero et al., 2014). A spermiumok genetikai károsodása több szinten is előfordulhat, és ezek potenciális okozói lehetnek a férfi meddőségnek. A spermium DNS-e a genetikai anyag felét biztosítja az utódok számára, emiatt is fontos, hogy a genetikai anyag megfelelő legyen, hiszen fontos szerepe van a megtermékenyítés sikerében, az embrió és a magzat fejlődésében (J. L. Liu et al., 2020). Több kutatás is kimutatta, hogy a spermiumok genom szerveződésének hibái negatívan korrelálnak a spermiumok termékenységi potenciáljával. Továbbá a vizsgálatok arra is rávilágítottak, hogy ezek a rendellenességek hozzájárulnak az ICSI, és az IUI sikertelenségéhez (SALLAM et al., 2023).

A szerzett tényezők közül a varicocele (herevisszér tágulat) a férfiak meddőségének leggyakoribb és korrigálható oka, 40%-os prevalenciával. A kutatások rávilágítottak arra, hogy a varicocele valóban befolyásolja a spermatogenezist és összefüggést mutat a rendellenes spermiumokkal ("Report on Varicocele and Infertility: A Committee Opinion," 2014). Bármilyen is a fiziopatológiája, elegendő bizonyíték áll rendelkezésünkre annak bizonyításához, hogy fokozatos herekárosodást okozhat. Lehetséges kóroki mechanizmusok lehetnek a következők: a katabolitok visszaáramlása a mellékvese mirigyekhez, az alacsony oxigénkoncentráció, valamint a megnövekedett CO₂-, tejsav- és norepinefrin-koncentráció (Agarwal & Esteves, 2016). Ugyanakkor vita folyik arról, hogy a varicocele kezelése valóban javítja-e a termékenységet, vannak érvek és ellenérvek is mellette. Számos egészségügyi állapot befolyásolhatja a férfiak termékenységét, ami hangsúlyozza a betegek alapos vizsgálatának

szükségességét a kezelhető vagy visszafordítható életmódbeli tényezők, valamint az egészségügyi állapotok azonosítása érdekében (Agarwal & Esteves, 2016). Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az apai egészség a fogantatás idején hatással lehet az utódok anyagcsere-egészségére és szaporodási potenciáljára az epigenetikai módosulások nemzedékek közötti átvitele révén (Pellati et al., 2008). Egy kutatásba 744 meddő férfit vontak be, a vizsgálat kimutatta, hogy a prediabéteszre utaló kritériumokat teljesítő férfiak 15,4%-ánál fokozott a hipogonadizmus, a spermium DNS-fragmentáció (SDF) és a nem obstruktív azoospermia kockázata (Rao et al., 2005). A férfi reprodukív rendszerre különböző környezeti tényezők hatnak, melyek hozzájárulhatnak a férfi meddőség kialakulásához (Leaver, 2016). Számos exogén, toxikus anyagnak van kitéve az emberi szervezet, mint például növényvédő szerek, herbicidek, kozmetikumok, tartósítószer, tisztítószer és ipari melléktermékek. Továbbá a nehézfémekkel való érintkezés is károsan befolyásolja a reprodukciót (Manouchehri et al., 2022). Az ólom, a kadmium és a higany negatívan befolyásolhatja a férfi reprodukív rendszert azáltal, hogy megzavarják a hipotalamusz-hipofízis tengelyt vagy közvetlenül a spermatogenezist, rontva ezzel az ondó minőségén (López-Botella et al., 2021). Több tanulmány is kimutatta, hogy magas ólomszint esetén jelentősen csökkent a spermiumok sűrűsége és mozgékonyasága. Magas kadmiumkoncentráció szintén ronthatja az ondó minőségét azáltal, hogy alacsonyabb spermiumszámot és csökkent mozgékonyaságot eredményez (Houston et al., 2021). A higany magas szintje pedig károsíthatja a spermiumok genetikai anyagát, csökkentheti a mozgékonyaságot és rendellenes morfológiát okozhat (Agarwal et al., 2021b).

Az oxidatív stressznek is fontos szerepe van az emberi reprodukcióban, mely a túlzott reaktív oxigén gyök (reactive oxygen species, ROS) termelés vagy az antioxidáns védekező mechanizmusok károsodása következtében alakul ki (Takalani et al., 2023). A spermiumokra gyakorolt káros hatásuk következtében a túlzott ROS-t inaktiválni kell, úgy, hogy csak a normális sejtfunkció fenntartásához szükséges mennyiség maradjon meg (Sakkas & Alvarez, 2010a). A ROS által okozott károk főként a spermiumok plazmamembránját érintik, ami magyarázattal szolgálhat a meddő férfiakkal gyakran megfigyelhető funkcionális hibákra. Az oxidatív stressz főleg a spermiumok DNS integritását és a spermium funkcionális paramétereit károsítja, ami a spermiumok mozgékonyaságának és életképességének csökkenéséhez vezethet (Ollero et al., 2001a). A ROS-nak több típusa is van, amelyek jelentős szerepet játszanak a reprodukcióban. Ilyenek például a szuperoxid-anion (O_2^-), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hidroxilgyökök ($OH^\cdot$). A ROS-nak egyaránt van fiziológiai és patológiás szerepe a férfi meddőségben. A fiziológiai szintű ROS-nak fontos szerepe van a spermiumok érési folyamataiban, valamint a kapacitációban, akroszómális reakciókban és a megtermékenyítés folyamatában (Enciso et al., 2009). Másfelől a patológiás szinten levő ROS-ok súlyos károkat okozhatnak. Ezek származhatnak leukocitákból vagy éretlen, abnormális spermiumokból (Takalani et al., 2023).

Az életmódbeli tényezők is befolyásolhatják a termékenységet, mint például az életkor, táplálkozás, mozgás, dohányzás, alkohol- és koffeinfogyasztás (Leaver, 2016). Egy tanulmány kimutatta, hogy a spermium mozgékonyasága és életképessége szignifikánsan csökken az életkor előrehaladtával, különösen 35 éves kor után. Ugyanakkor a spermiumszámra gyakorolt hatása kevésbé jelentős (Ma et al., 2019). Az elhízás manapság globális probléma, amely világszerte fokozódik. A túlsúly nemcsak a krónikus betegségek kockázatát növeli, hanem a reprodukcióra is negatív hatással van (Andrabi et al., 2024). Több tanulmány is kimutatta, hogy a túlsúlyos férfiak körében magasabb az azoospermia és az oligozoospermia előfordulása (Boeri et al., 2019). Emellett a dohányzó férfiakkal alacsonyabb a spermiumszám, rosszabb a

mozgékonyság, és gyakoribbak a rendellenes morfológiájú spermiumok. Egy kutatás során kiderült, hogy a dohányzó férfiaknál 19%-kal alacsonyabb volt a spermiumszám a nem dohányzókéhoz képest (R. Sharma et al., 2016).

A terméketlen férfi páciensek vizsgálata elengedhetetlen a meddőség potenciálisan kezelhető okainak azonosításához és a megfelelő terápia kiválasztásához. Az elmúlt években jelentős előrelépés történt a férfi meddőség okainak feltárásában, megértésében és kezelési lehetőségeiben (Agarwal et al., 2021b).

1.4. DNS-fragmentáció

A DNS-fragmentáció a spermiumok genetikai anyagának sérülése, amely során a DNS-láncok törései, valamint hibái alakulnak ki. A DNS-törések lehetnek egyszeresek vagy kettős szálúak (Nagata, 2000). A spermiumok DNS-károsodása befolyásolhatja mind a mitokondriális, mind a nukleáris DNS-t, és hat fő mechanizmus indukálhatja (Sakkas & Alvarez, 2010b). Ezek a folyamatok előfordulhatnak a spermiumok termelése vagy szállítása során egyaránt. Ezek közé tartozik: (1) Apoptózis a spermatogenezis folyamata során; (2) DNS-szál törések a spermium kromatinjának átalakulása során; (3) Poszttesztikuláris DNS-fragmentáció; (4) DNS-fragmentáció endogén kaspázok és nukleázok által; (5) DNS-károsodás rádioterápia és kemoterápia által; (6) DNS-károsodás környezeti toxikus anyagok által (Bianchi et al., 1993). Ezek a mechanizmusok együttesen vagy egymás nélkül is hozzájárulhatnak a spermiumok DNS-fragmentációjához, amely pedig befolyásolhatja a reprodukció kimenetelét (Sakkas, 1999). A spermatogenezis folyamata során a Sertoli-sejtek által szabályozott ellenőrzési mechanizmusok körülbelül 50-60%-ában apoptózist indukálnak a meiózis I-be belépő csírasejtek esetén. Ezek a sejtek Fas típusú apoptotikus markerekkel vannak jelölve, a Sertoli-sejt feladata, hogy fagocitózis majd elimináció menjen végbe (Pentikäinen et al., 1999). Előfordulhat, hogy ez a mechanizmus nem mindig működik hatékonyan, és a hibás csírasejtek különböző százaléka a spermiogenezis során belép a spermiumok átalakulási folyamatába, majd ezáltal megjelenik az ejakulátumban (Sakkas et al., 2002). Ennek a szűrési mechanizmusnak a hibáját illetően, egy nemrégén végzett tanulmány eredményei szerint disszociáció van a csírasejt genomi minősége és a spermiogenezis során végbemenő spermium-átalakulás között (Burrello et al., 2004). Ez azt jelenti, hogy egy csírasejt sejtmagja megsérülhet apoptózis miatt, vagy aneuploid lehet, de ennek ellenére a keletkező spermium morfológiája normális lesz (Sakkas, 1999). A spermiogenezis során a kromatin átalakulásában bekövetkező változások is DNS-fragmentációt eredményezhetnek. McPherson és Longo azt feltételezték, hogy a DNS-hasadások jelenléte az ejakulált spermiumokban, a spermiogenezis során bekövetkező hibás érést jelezheti (S. M. G. McPherson & Longo, 1993). Úgy gondolták, hogy a kromatin csomagolása endogén nukleáz aktivitást igényelhet a hasadások létrehozásához és ligálásához, amelyek ezt követően elősegítik a protaminációt (S. M. McPherson & Longo, 1992). Ennek a folyamatnak a szabályozásában bekövetkező változások kromatin csomagolási rendellenességeket vagy javítatlan DNS-hasadásokat eredményezhetnek (S. M. G. McPherson & Longo, 1993).

A legújabb tanulmányok kimutatták, hogy azok az éretlen spermiumok, amelyek magas szintű ROS-t termelnek, DNS-károsodást okozhatnak az érett spermiumokban. Ez a károsodás a spermációt követően keletkezik, amikor az érett és éretlen spermiumok az ondóvezetékcsőből a cauda epididymisbe vándorolnak (Ollero et al., 2001b). Bár a ROS felezési ideje nano- és mikroszekundumos nagyságrendű, mivel a spermiumok erősen tömörülnek az epididymisben,

ez elősegítené a ROS-indukált DNS-károsodást. A ROS közvetlenül vagy közvetve károsíthatja a spermium DNS-ét a spermium kaspázok és endonukleázok aktiválása révén (Sakkas & Alvarez, 2010b). Ez összefügg azzal a ténnyel, hogy az éretlen spermiumok (amelyeknek magas a ROS-szintje) érett spermiumokkal való kocentrifugálása a spermium DNS fragmentációjának indukcióját eredményezi az érett spermiumokban, mivel ilyen körülmények között az érett és éretlen spermiumok szoros kapcsolatban állnak egymással (Twigg et al., 1998). Ez összefügg azzal a ténnyel is, hogy az érett spermiumok in vitro ROS-expozíciója jelentős DNS-károsodást eredményez (Lopes, Jurisicova, et al., 1998). Másrészt, a mellékhere hámsejtjei aktív szerepet játszhatnak az ROS által indukált DNS-károsodásban, olyan ROS-ok révén, mint a hidroxilgyök vagy a nitrogén-oxid (Britan et al., 2006) vagy a spermiumok kaspázainak és endonukleázainak aktiválásán keresztül fizikai-kémiai tényezők, például magas hőmérséklet és környezeti tényezők által (Banks et al., 2005). Az első esetben ez a károsodás elméletileg megelőzhető lenne antioxidánsok alkalmazásával, azonban a második esetben ez a kezelés nem lenne hatékony. Előbbi támogatja alá egy tanulmány, amelyben az antioxidánsok használata a spermium DNS-fragmentációjának jelentős csökkenését eredményezte (Greco et al., 2005a).

Korábban már beszámoltak arról, hogy a kemoterápia és a sugárterápia a spermiumok DNS-fragmentációját is előidézheti. Úgy vélik, hogy a rákkezelések negatív hatással vannak a férfi termékenységre, és a spermiumok termelésének csökkenése a kemoterápia vagy a sugárterápia germinális hámra gyakorolt citotoxikus hatásából adódik (Morris, 2002a). Korábbi tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a magas szintű levegőszennyeztségnek való kitettség összefüggésben áll a spermiumok DNS-károsodásának növekedésével (Twigg et al., 1998). Egy nemrég végzett vizsgálatban kiterjesztették ezeket a megfigyeléseket, és felállítottak egy hipotézist, mely szerint a glutation-S-transzferáz M1 homozigóta nullával rendelkező férfiak kevésbé képesek a légszennyezésben található rákkeltő policiklikus aromás szénhidrogének reaktív metabolitjainak méregtelenítésére (Rubes et al., 2007). Arra a következtetésre jutottak, hogy ezek a férfiak érzékenyebbek a légszennyezés spermiumkromatinra gyakorolt hatására (Sakkas & Alvarez, 2010b). Egy vizsgálat során, amelyben a férfiak spermiummintákat adtak le, mind az alacsony (alapállapot), mind az epizodikusan magas légszennyezettésgű időszakokban, a kutatók statisztikailag szignifikáns összefüggést találtak a glutation-S-transzferáz M1 null genotípus és a spermiumok fokozott DNS-fragmentációja között. Ezenkívül a glutation-S-transzferáz M1 null genotípusú férfiaknál a spermiumok DNS-fragmentációja is magasabb volt az időszakos légszennyezésnek való kitettség hatására (Rubes et al., 2007).

Összességében, a DNS-fragmentáció jelenléte a spermiumokban rengeteg publikációt generált az elmúlt évtizedben. A fragmentálódott spermiumok jelenléte vitathatatlan, függetlenül annak eredetétől, az embrióra és az utódokra gyakorolt hatásáról, valamint a diagnózis felállításának szükségességéről, amelyek további megértést igényelnek (Sakkas & Alvarez, 2010b).

1.5. DNS-fragmentáció-visszatérő vetélés

Spontán vetélés a normál termékeny populációban a klinikai terhességek 10–15%-ában fordul elő, de ismert, hogy ez az arány magasabb a szubfertilis pároknál (Hamamah, 1997). A DNS-fragmentációval rendelkező spermiumok képesek megtermékenyíteni a petesejtet, ami magyarázattal szolgálhat, azon tanulmányokra, amelyek a magas DNS-károsodás és a

terhességi arányok közötti kapcsolatot vizsgálták, azonban csak mérsékelt hatást találtak a hagyományos IVF megtermékenyítési arányaira, és alig találtak arra bizonyítékot, hogy bármilyen hatással lenne az ICSI esetében (Gandini, 2004; Lopes, Sun, et al., 1998). Számos tanulmány számolt be arról, hogy a spermiumok DNS-károsodásának kedvezőtlen hatása van a termékenységre (Coughlan et al., 2015). A spermium DNS-fragmentációja összefüggésbe hozható a sikertelen megtermékenyítéssel, a teherbeeséshez szükséges hosszabb időtartammal, a stimulált méhen belüli megtermékenyítést követő sikertelenséggel, az embrió fejlődésének károsodásával, a magasabb vetelési aránnyal és a terhesség elvesztésének fokozott kockázatával, mind az IVF, mind az ICSI után (Evenson & Wixon, 2008a). A spermium DNS-károsodásának messzemenő következményei lehetnek a reprodukív kimenetelre nézve. Arra a következtetésre jutottak, hogy fontos lehet a spermiumok DNS-károsodásának vizsgálata, főként a beültetés sikertelensége és visszatérő vetelés esetén (Coughlan et al., 2015). Ezért ennek a tanulmánynak az volt a célja, hogy még több bizonyítékot találjanak, amivel alá tudják támasztani a hipotéziseket és az eddigi eredményeket, valamint, hogy megvizsgálja a spermium DNS-fragmentációja közötti kapcsolatot az IVF, (recurrent miscarriage, RM) után ismétlődő implantációs kudarcot (Repeated Implantation Failure, RIF) diagnosztizált nők férfi partnereiben, valamint azoknál a férfiaknál, akik nemrég váltak apává (Coughlan et al., 2015). A vizsgálat során kettő, kereskedelembe kapható tesztet használtak, és vizsgálták mind az ejakulált spermiumokat, mind a sűrűség-gradiens centrifugálást (DGC) követően kinyert spermiumokat. Összességében azt az eredményt kapták, hogy a két teszt és a spermium előkészítési módszer alkalmazása során jelentős mennyiségi különbségek mutatkoztak a három csoport eredményei között, azonban nem volt meggyőző bizonyíték arra, hogy az eredmények felhasználhatók lennének a három csoport megkülönböztetésére (Coughlan et al., 2015).

Az ismétlődő beültetési kudarc és az RM a reprodukciós kudarc két típusa, amelyek előfordulási gyakorisága és megjelenési formája eltérő. A kettő vagy több egymást követő vetelés meglehetősen ritka, a nők körülbelül 0,5%-ánál –3%-ánál fordul elő, míg az IVF-et követően a betegek 48%-a nem éri el az élveszületést 3 kezelési ciklust követően, ezért RIF-nek minősül (Bricker, 2002; STIRRAT, 1990). A spermiumok DNS-fragmentációjának vizsgálatára irányuló korábbi vizsgálatok RM-betegeknél eltérő eredményeket mutattak. Például a tanulmány során 74 olyan férfi páciens spermiumát vizsgálták, akiknek partnere RM-kórelőzménnyel rendelkezik (Bhattacharya, 2008). Statisztikai különbséget találtak, amikor ezeket az eredményeket összevetették 65 olyan férfitől származó mintával, akik nemrég váltak apává (CARRELL et al., 2003). Hasonló eredményeket mutattak ki, amikor a TUNEL-teszt segítségével 24 olyan párt vizsgáltak, akiknél megmagyarázhatatlan visszatérő vetelés állt fenn. Ezen minták eredményei szignifikánsan különböztek a donoroktól, és a nem szűrt férfiaktól kapott spermiumok eredményeitől (Gil-Villa et al., 2010). Ezzel szemben a spermium kromatin integritását 23 visszatérő veteléssel rendelkező pár és 11 friss apa izolált mozgékony spermáján vizsgálták, hogy megállapítsák, a spermakromatin szerkezeti vizsgálat

eredményeinek nincs súlya az elemzésben (Ribas-Maynou et al., 2012). További vizsgálatokat folytattak, amelyekben az Y kromoszóma mikrodélációit, a spermium DNS-fragmentációját és az oxidatív stresszt vizsgálták ismeretlen etiológiájú ismétlődő spontán vetelés okaként, és arra a következtetésre jutottak, hogy a spermium DNS-fragmentáció nem rendelkezik megfelelő prediktív erővel ahhoz, hogy diszkriminatív vizsgálatként alkalmazható legyen az ismétlődő spontán vetelés esetében (Bellver et al., 2010). Ebben a tanulmányban bemutatott eredmények alapján nem lehet alátámasztani azt a hipotézist, hogy a spermium DNS-fragmentációja az RM vagy RIF főbb okai közé tartozik, és azt sem, hogy ezek a DNS-fragmentációs tesztek prediktív értékkel bírnak az RM és RIF kockázatának kitett nők

prospektív azonosításában (Coughlan et al., 2015). Azonban 16 tanulmány alapján, melyekbe 2969 beteg bevonása történt, az elvégzett vizsgálatok során a metaanalízis azt mutatta, hogy a magas DNS-károsodással (kockázati arány = 2,16 [1,54, 3,03], $P < 0,00001$) szenvedő betegekénél szignifikánsan megnőtt a vetélések száma az alacsony DNS-károsodású betegekéhez képest (Ribas-Maynou et al., 2012). Emellett más tanulmányokban a megnövekedett DNS-károsodást összefüggésbe hozták a férfiak korával, amely növelheti a vetélés kockázatát, ha a gyermekvállalás idősebb korban történik (Evenson & Wixon, 2008b).

Több kutatás is megjelent, amelyben a vetélés és a spermiumok magas DNS-fragmentációja közötti kapcsolatot vizsgálták (Bungum et al., 2007) és arra a következtetésre jutottak, hogy a spermium DNS-károsodása a terhesség elvesztésének szignifikánsan megnövekedett kockázatával jár együtt IVF és ICSI-t követően (Zini et al., 2008a). Egy vizsgálat során a spermiumok DNS-fragmentációját elemezték olyan pároknál, akik spontán próbáltak teherbeesni. 2 csoportra osztották őket, az egyik csoportról azt feltételezték, hogy nem állnak fenn termékenységi problémák, a másik csoportba azokat a pácienseket osztották be, akiknek a kórelőzményében szerepelt már vetélés (Evenson & Wixon, 2008c). Ez a tanulmány összefüggést mutatott ki a vetélés és a magas DNS-fragmentáció között, valamint az SCSA adatok 18 vetélésből 7-et (39%) tudtak megjósolni (Aitken & De Iuliis, 2007). Egy másik kutatás során a DNS-károsodást és a vetélések arányát vizsgálták ejakulált spermiumokból, valamint a herében lévő spermiumokkal összehasonlítva (Greco et al., 2005b). Azt az eredményt kapták, miszerint az ejakulált spermiumokban sokkal magasabb volt a DNS-károsodás. Ez azzal a hipotézissel magyarázható, hogy a DNS-károsodás nagy része poszttesztikuláris szinten keletkezik (Robinson et al., 2012). Ennek a tanulmánynak az eredményei összhangban vannak más tanulmányokkal, amelyek azt mutatják, hogy a DNS-károsodott spermiumok sikeresen megtermékenyíthetik a petesejtet, és jó minőségű embriókat eredményezhetnek, amelyek azonban később nem tudnak beágyazódni, akár korai vetéléshez vezethetnek (Aitken et al., 1998; Morris, 2002b; Tesarik, 2004). A DNS-fragmentáció magas szintje előre jelezheti a felmerülő problémákat, ezért a továbbiakban ennek ismerete hasznos lehet a kezelések tervezésében (Bungum, 2004).

2. Célkitűzések

Munkánk során több célkitűzésünk is volt:

1. Retrospektív adatelemzések során a spermiumok DNS-fragmentációs indexe (DFI) és egyéb funkcionális paramétereik (koncentráció, motilitás, progresszív motilitás és vitalitás) közötti összefüggések vizsgálata.
2. Annak vizsgálata, hogy a natív ondó minta, mely élő, illetve apoptotikus, nekrotikus sejtek, spermiumok együttese; valamint áramlási citometriásan kapuzott élő spermiumok DNS-fragmentációja mutat-e eltérést.
3. Vizsgálni kívántuk, hogy az egyes ondó feldolgozási technikák hogyan hatnak a preparált minta motilitására/vitalitására. Az egyes technikák során bedúsított mozgó/élő sejtek aránya hogyan nyilvánul meg a DFI értékben.
4. Végezetül, ha a mozgó/élő sejtek arányának növekedéséből egyértelműen következik a DNS-fragmentáció csökkenése, akkor van-e bármilyen létjogosultsága a DNS-fragmentáció meghatározásának asszisztált reprodukciós eljárások során, hiszen pl az ezen eljárások során alkalmazott intra citoplazmatikus spermium injektáláshoz mozgó spermiumokat használunk, melyből következik az alacsonyabb fragmentációs érték.

3. Anyag és módszer

3.1. Mintagyűjtés, funkcionális paraméterek meghatározása

A munkánk során használt ondóminták gyűjtése maszturbációval történt, melyek vizsgálatát elfolyósodás után kezdtük meg, de nem több, mint 1 órával a mintaadást követően.

Koncentráció meghatározás

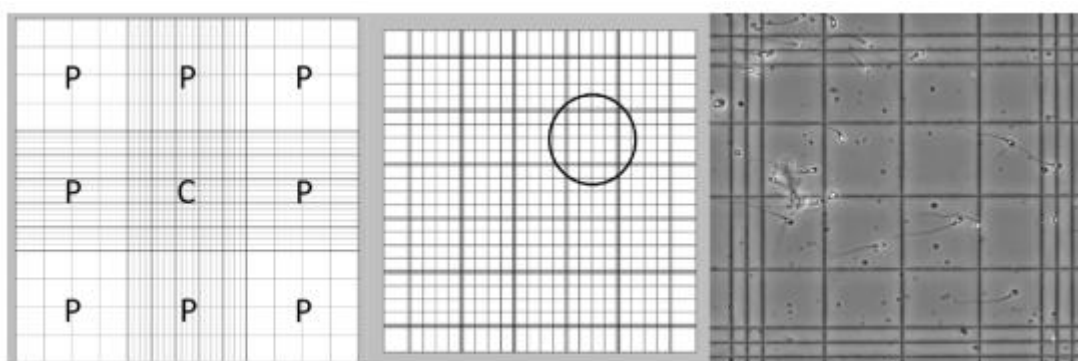
Az elfolyósodott mintából kicseppentünk tárgylemezre, hogy meghatározzuk a szükséges fixáló hígítás mértékét. Ehhez segítségként a WHO kézikönyvben található táblázatot alkalmazzuk.

Fixálóként a leukocita meghatározáshoz használt oldatot használjuk: 10 ml 0,9%-os Nátrium-klorid 25 µl 3%-os Peroxid oldat, 50 µl O-Toluidin.

Spermatozoa per ×400 field	Spermatozoa per ×200 field	Dilution	Ejaculate (µl)	Fixative (µl)
> 200	> 800	1 : 50 (1 + 49)	50	2 450
40-200	160-800	1 : 20 (1 + 19)	50	950
16-40	64-160	1 : 10 (1 + 9)	50	450
2-15	8-64	1 : 5 (1 + 4)	50	200
< 2	< 8	1 : 2 (1 + 1)	100	100

A fixáló oldattal összekevert ondó mintából 10µl-t felviszünk Neubauer kamrára és hagyjuk 10 percet állni, hogy a spermiumok a kamra teljes egészében homogénen leülepedjenek. A mintából 2 párhuzamos replikátumot készítünk.

Az idő leteltével megkeressük a számláló kamra közepén található 25 (5x5) négyzetből álló térhálót, melyben minden négyzet további 16 (4x4) kis négyzetet tartalmaz. Az 5x5-ös háló minden egyes négyzete 3-as vonallal van körbevéve, melyből a középső vonal képviseli a négyzet határát. Ha a számlálandó spermium feje pont ezen a vonalon helyezkedik el, akkor csak akkor számoljuk, ha az a határvonal alsó vagy bal oldali szélén helyezkedik el.



A 25 négyzetrácsból legalább annyiban leszámoljuk a spermiumokat, hogy 200 spermium összegyűljön.

$$\frac{\text{Számolt spermium} \times \text{hígítás}}{\text{Leszámolt négyzetek száma} \times \text{kamra mélység}} \times 1000$$

Motilitás meghatározás

A spermiumok motilitásának meghatározásához az elfolyósodott mintából egyszer használatos fecskendővel 1-1 cseppet kicseppentünk tárgylemezre és 18X18 mm-es fedőlemezzel lefedjük. 100 spermium leszámolásával meghatározzuk a teljes és a progresszív (előre haladó) motilitást. Amennyiben két vizsgálati eredmény között 10 % eltérés van a vizsgálat ismétlése szükséges.

Vitalitás meghatározás

Tárgylemezre felvitt, elfolyósodott ondó csepphez egy csepp 5%-os Eosint keverünk, majd 18X18 mm-es fedőlemezzel lefedjük. 100 spermium leszámolásával meghatározzuk a vitalitást. Az élő spermium fehér, az élettelen pirosra színeződik. Amennyiben két vizsgálati eredmény között 10% eltérés van a vizsgálat ismétlése szükséges.

3.2. Spermiumfeldolgozási technikák

3.2.1. Sűrűség-gradiens centrifugálás (DGC)

A DGC során 15ml kónuszos centrifugacsőbe egymásra rétegezzük fecskendővel 1ml alsó, 1ml felső oldatot, valamint 2ml ondót. 400g fordulatszámon 12 percig centrifugáljuk a mintát, majd a pellet aljából 0,2-0,3 ml-nyi mennyiséget, az ülepitett spermiumokat tartalmazó részt, egyszer használatos Pasteur pipettával kiszívjuk és egy másik centrifuga csőbe helyezzük, melyet előzőleg lángban sterilizálunk. Mosófolyadékkal 3ml-es jelig feltöltjük, majd 300g fordulatszámon 10 percig centrifugáljuk a mintát. Centrifugálás után a felülúszót óvatosan leszívjuk kb. 0,2 ml-t hagyva a cső alján. Ez a réteg az adott ondóból származó spermiumokat dúsítja, tisztítva tartalmazza. Kezelés utáni spermium szám és motilitás meghatározás történik végül.

3.2.2. Swim-up (SU)

A swim-up (SU) feldolgozási technika a spermiumok mozgékonyaságán alapszik, az ondóplazmából való kiúszási képessége alapján választhatóak ki a spermiumok.

15ml-es kónuszos centrifugacsőbe mérünk 2ml mosó tápoldatot, az ondó mintát pedig a mosóoldat alá rétegezzük. Ezt követően a centrifugacsövet 45 fokban megdöntjük, melynek köszönhetően növekszik az ondó, illetve a mosóoldat érintkezési felülete. A megdöntött centrifugacsövet 37 °C-os inkubátorba helyezzük 1 órára. Az inkubálás leteltével a mosóoldatot a felúszott spermiumokkal egyetemben fecskendő segítségével óvatosan leszívjuk és új csőbe helyezzük.

3.2.3. Mágneses-sejtszeparálás (MACS)

Az ejakulátum elfolyósodását követően DGC-t hajtunk végre: a mintát 12 percig 400 g-vel centrifugáljuk, és a felülúszót eltávolítjuk. Az üledéket 1 ml Binding pufferrel szuszpendáljuk és a szuszpenziót 4 percig 300 g-vel centrifugáljuk, majd a felülúszót megint eltávolítjuk. Az üledékre rámerjük a mágneses gyöngyökkel jelölt annexin V oldatot (kb 200 µl) és 500 µl-ig kiegészítjük Binding pufferrel. Ezt követően a szuszpenziót 15 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáljuk, és 5 percenként kicsit felkeverjük. A 15 perc lejártá előtt 5 perccel a mágneses betétbe behelyezzük egy szeparáló oszlopot és egy 5 ml-es csőbe átmossuk 1 ml Binding pufferrel. Miután lejárt a 15 perc, az oszlop alá helyezünk egy 15 ml-es kónuszos centrifugacsövet és az annexin V-el jelölt szuszpenziót (0,5 ml) átfolyatjuk a szeparáló oszlopon, bele a centrifugacsőbe, majd az oszlopot rámoszuk 0,5 ml Binding pufferrel. A lefolyt

szuszpenziót 4 percig 300 g-vel centrifugáljuk, majd a felülúszót eltávolítjuk, és az üledéket 2 ml mosóoldattal átmoszuk és 4 percig 300 g-vel centrifugáljuk. A felülúszót leszívjuk, de a mosóoldatból hagyunk a cső alján, melyben felszuszpendáljuk az üledéket. Végül meghatározzuk a szuszpenzió paramétereit (koncentráció, motilitás, progresszív motilitás).

3.2.4. CHIP-technológia

Az ejakulátumból elfolyósodását követően fecskendővel felszívunk 850 µl ondómintát, majd 1 ml-es fecskendővel felszívunk még 750 µl mosóoldatot. Az 1 ml-es fecskendőt tű nélkül ráhelyezzük a szeparáló chip „kifolyó” nyílására, majd 50 µl mosó oldatot lassan befecskendezünk. A maradék 700 µl mosóoldatot rácsepegtetjük a középső, szeparáló területre. A szeparáló chipet egy 90 mm átmérőjű petri-csészébe helyezzük, majd 15 percre 37 fokra trigáz inkubátorba helyezzük. Ezután a 15 perc leteltével kivesszük a csészt, majd a „kifolyó” nyílásra helyezzük az 1 ml-es fecskendőt, és a szeparáló chipet óvatosan a sarkára állítjuk, majd ezt követően leszívunk 0,5 ml szuszpenziót. A fecskendő tartalmát névvel ellátott kónuszos centrifugacsőbe ürítjük, majd meghatározzuk a szuszpenzió paramétereit (koncentráció, motilitás, progresszív motilitás).

3.3. Sperm chromatin structure assay (SCSA) teszt

Az SCSA spermium DNS-fragmentációs meghatározás a Cariat cég erre a célra fejlesztett reagenszinek segítségével történt. Nevezetesen:

Az elfolyósodott ondó mintát, a koncentráció ismeretében 1×10^6 spermium / ml sejtszámra hígítunk az A reagenssel, 100 µl végtérfogatban egy 1,5 ml-es PCR csőben. Ehhez az elegyhez hozzá adunk 200 µl B reagenst és 30 másodpercig gyengén kevergetjük. Ezt követően hozzá adunk 600 µl C reagenst (1 ml C1 és 6 µl C2 keveréke, fénytől védve) és alapos homogenizálását követően fénytől védve 5 percig inkubáljuk a csöveket.

A mérés MACSQuant 16 típusú áramlási citométerrel történt. A gerjesztés 488 nm-en történt, a nem fragmentált DNS-sel rendelkező sejtek detektálása 525 nm-en történt, a sejtek zöld fluoreszcenciát mutatnak, a fragmentált DNS-sel rendelkezőké pedig 680 nm-en, melyek piros fluoreszcenciájúak. A törmelék kikapuzását követően a minta DNS-fragmentációs index (DFI) értéke = piros fluoreszcenciájú sejtek / piros + zöld fluoreszcenciájúak.

Azoknál a vizsgálatoknál, ahol a teljes ejakulátum, illetve a kapuzott élő sejtek összehasonlítása történt, ott a teljes folyamatot megelőzően előjelölés történt. Erre a célra Viobility nevű jelölőt alkalmaztunk (Miltenyi Biotec), mely 405 nm-en gerjesztődik, 452 nm-en pedig emittál. A gyártói ajánlásnak megfelelően alkalmaztunk, 100 µl végtérfogatú 10^6 sejt / ml-es szuszpenzióhoz 1 µl jelölőt adtunk, majd 15 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációt követően a sejteket 300 g-n 10 percig centrifugáltuk, mostuk PBS-ben, majd ezt követte a Cariat cég protokollja.

3.4. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai kiértékeléshez, és a dolgozatban szereplő táblázatok elkészítéséhez a Graphpad Prism 8.0.1 programot használtuk. A statisztikai próbák elvégzése előtt minden vizsgálni kívánt csoport eloszlását megvizsgáltuk. Kisebb elemszám esetén Shapiro-Wilk, míg nagyobb elemszám esetén Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. Az elemzésekhez kétmintás T-tesztet és egyutas ANOVA tesztet alkalmaztunk. Ha a főhatások szignifikánsnak bizonyultak,

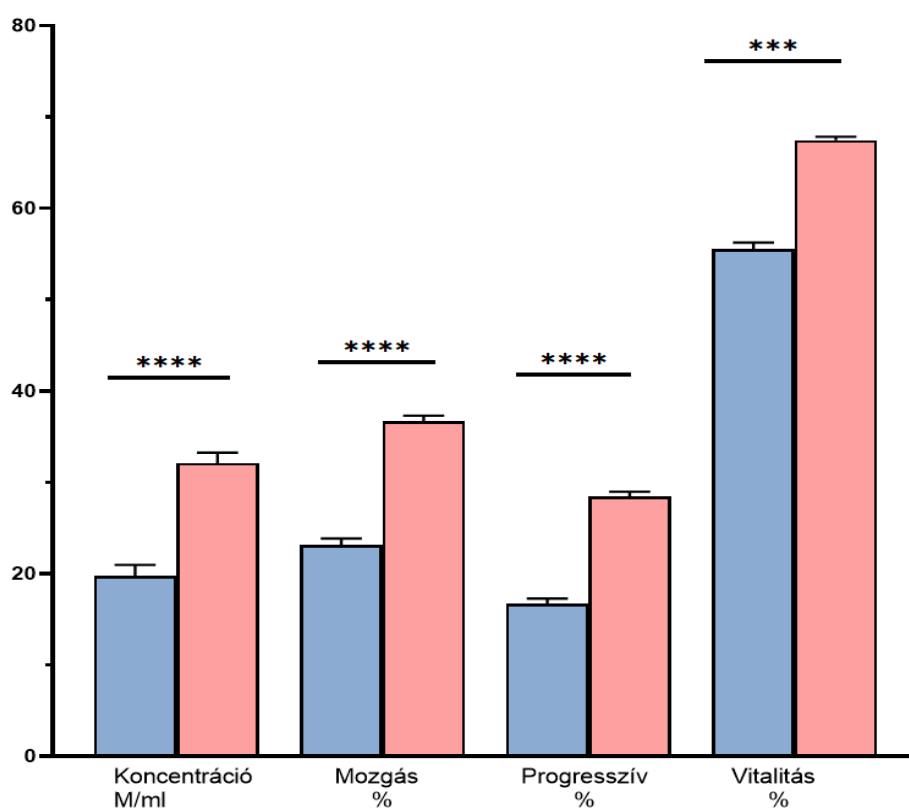
akkor a csoportok közötti különbséget Dunn-teszt vagy Tukey-teszt segítségével vizsgáltuk. Minden eredményt $p < 0,05$ érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. DNS-fragmentáció hatása a spermiumok funkcionális paramétereire

A Dunamenti REK Pannon telephelyén 2024 közepéig 1394 analízis történt, mely érintette a spermiumok koncentrációját, motilitását, progresszív motilitását, vitalitását és DNS-fragmentációját. Először ezt az adatsort ketté osztottuk a DNS-fragmentációs értékek alapján: DFI>25% és DFI<25%. A főhatás vizsgálata után ($H=5935$; $p<0,0001$; $df=11$) minden vizsgált paraméter esetén szignifikáns kapcsolatot kaptunk. Az alacsonyabb DFI. értékhez jobb értékek tartoznak. Jobb a koncentráció, jobb a motilitás értéke is, ezáltal jobb a vitalitási érték is. Ezzel szemben a magas DNS-fragmentációval rendelkező spermiumok biológiai funkciói jelentősen károsodnak, különösen a mozgékonyság, életképesség és koncentráció szempontjából.

Összehasonlítás	p-érték
Ondó mennyisége/ml (DFI>25%) vs. Ondó mennyisége/ml (DFI<25%)	$p>0,9999$
Koncentráció/ M/ml (DFI>25%) vs. Koncentráció/ M/ml (DFI<25%)	$p<0,0001$
Mozgás/ % (DFI>25%) vs. Mozgás/ % (DFI<25%)	$p<0,0001$
Progresszív /% (DFI>25%) vs. Progresszív /% (DFI<25%)	$p<0,0001$
Carentia/nap (DFI>25%) vs. Carentia/nap (DFI<25%)	$p>0,9999$
Vitalitás (DFI>25%) vs. Vitalitás (DFI<25%)	$p=0.0007$

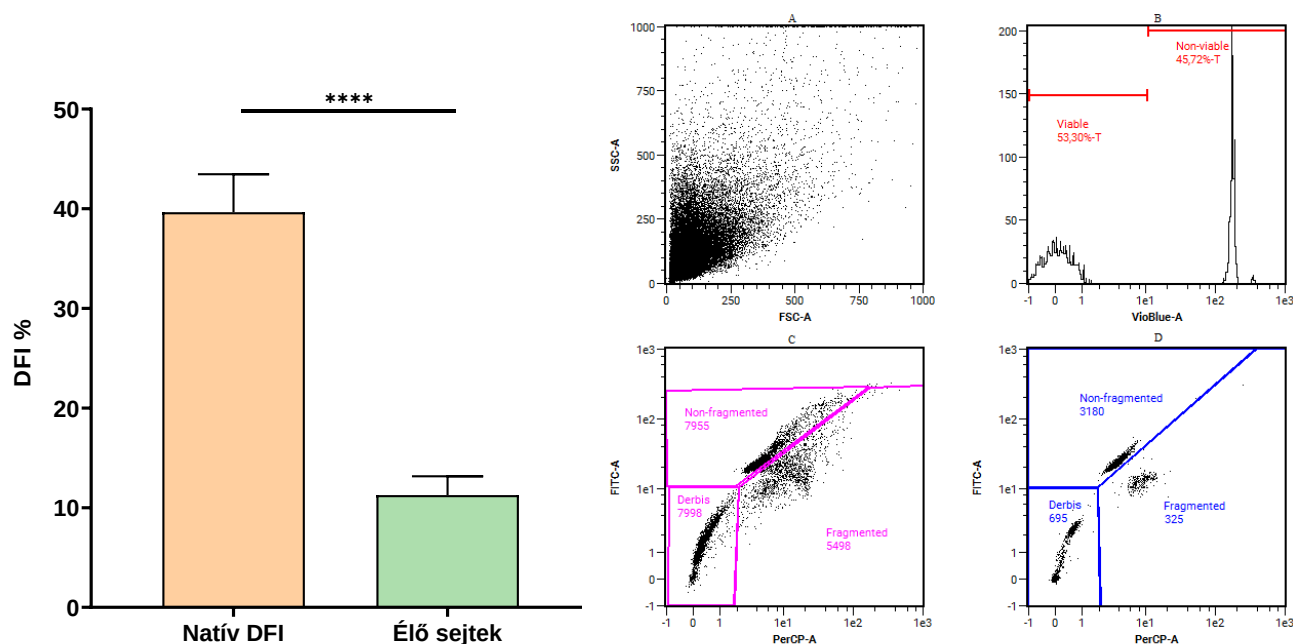


2.ábra: A Dunamenti REK Pannon telephely eredményeinek retrospektív elemzése látható az ábrán. 2 vizsgált csoportunk volt: DFI>25% (kék oszlop) és DFI<25 % (rózsaszín oszlop).

Minden vizsgált paraméter esetén szignifikáns kapcsolatot kaptunk.

4.2. DNS-fragmentáció teljes ejakulátum vs. élő sejtek

A DNS-fragmentáció értékét mértük natív teljes mintán, illetve kapuzott élő sejtek esetén. A DFI meghatározására az SCSA tesztet alkalmaztuk, amelyhez MACSQuant 16 típusú áramlási citométert és a Cariad gyártó SCSA DNS-fragmentációs kit-et használtuk. Az eredményekből látható, hogy a natív ejakulátumban jóval magasabb ($U=0$; $p<0,0001$, $N=11$) volt a spermiumok DFI értéke (39,64% vs. 11,27%). Az élő sejtek kiválogatásával a DFI már önmagában is csökken. Az élő spermiumok szelekciója javítja a DNS-integritást, mivel az elhalt vagy fragmentált DNS-sel rendelkező sejtek eltávolíthatók a mintából.

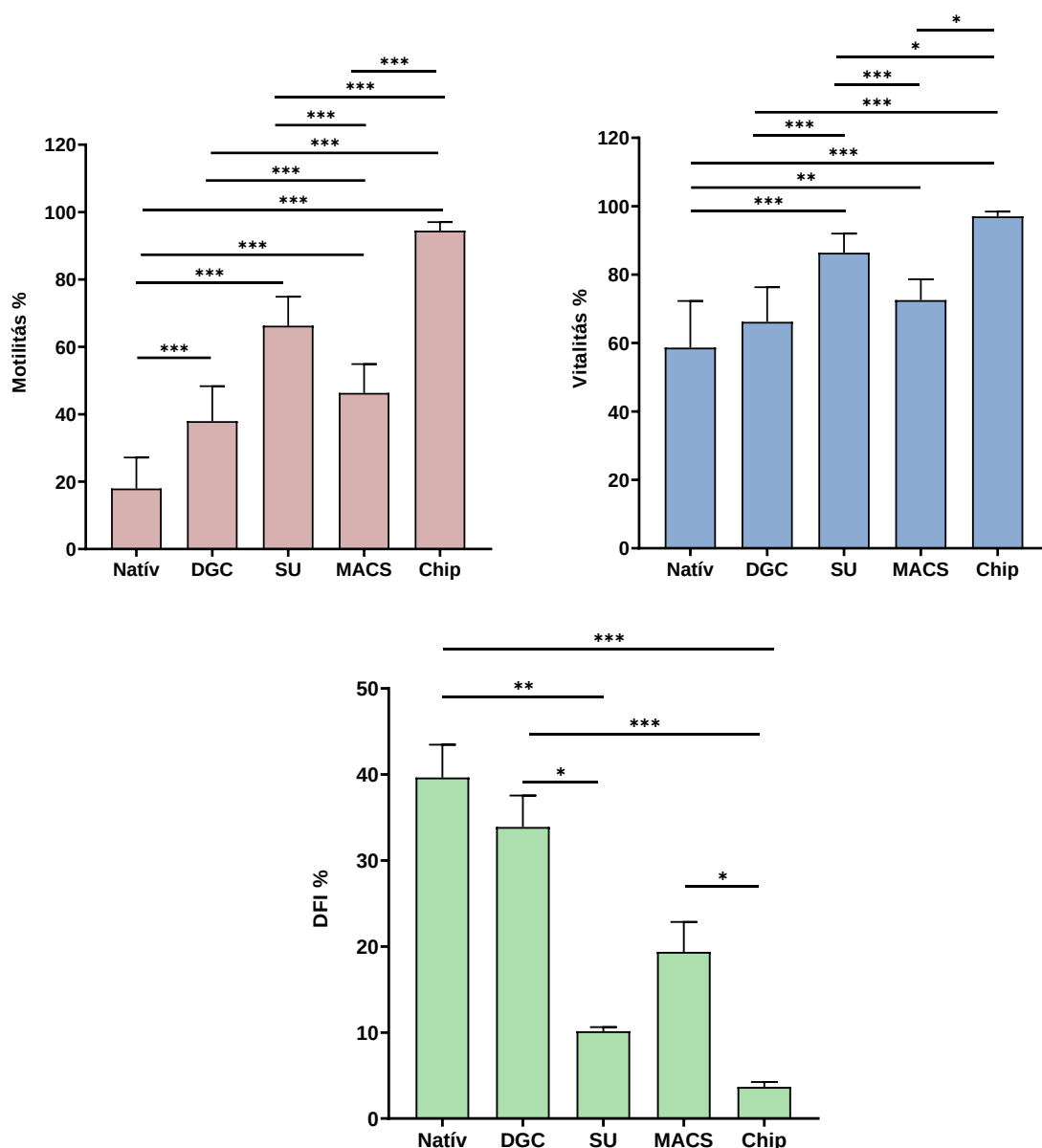


3.ábra: DNS-fragmentáció mérése natív mintán, illetve csak élő sejtek esetén. Élő sejtek esetén alacsonyabb DFI értéket kaptunk.

4.3. DNS-fragmentáció az egyes feldolgozási technikákat követően

Megvizsgáltuk, hogy a különböző feldolgozási technikák hogyan hatnak a spermiumok mozgására, ezáltal életképességére, valamint a DFI-re. A különböző spermiumfeldolgozási technikák hatékonyan csökkentették a DNS-fragmentációt ($H=41,81$; $p<0,0001$; $df=4$), javították a spermiumok vitalitását ($F=36,71$; $p<0,0001$; $df=4$) és motilitását ($F=134,6$; $p<0,0001$; $df=4$), ezáltal a funkcionális paramétereit. Kiemelkedően hatékony módszernek bizonyult a CHIP technológia, illetve az ugyan csak mozgékonyaság elvén működő SU technika. Az is megemlítenő, hogy az összes vizsgált módszer hatékonyan javítja a spermiumok mozgékonyaságát, vitalitását, ezáltal a DFI értékét. Ezekből az eredményekből az látszik, hogyha biztosan mozgó, biztosan élő spermiummal dolgozunk, a DFI is várhatóan jobb lesz.

Összehasonlítás	Motilitás %	Vitalitás %	DFI %
Natív vs. DGC	p<0,0001	p=0.2392	p>0,9999
Natív vs. SU	p<0,0001	p<0,0001	p=0.0033
Natív vs. MACS	p<0,0001	p=0.003	p=0.1721
Natív vs. Chip	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
DGC vs. SU	p<0,0001	p<0,0001	p=0.0294
DGC vs. MACS	p=0.1443	p=0.4118	p=0.7784
DGC vs. Chip	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
SU vs. MACS	p<0,0001	p=0.0032	p>0,9999
SU vs. Chip	p<0,0001	p=0.0378	p=0.3977
MACS vs. Chip	p<0,0001	p=0,0001	p=0.0109



4.ábra: Motilitás, vitalitás és DNS-fragmentáció az egyes feldolgozási technikákat követően. A különböző spermiumfeldolgozási technikák hatékonyan csökkentik a DNS-fragmentációt és javítják a spermiumok funkcionális paramétereit.

5. Következtetések

5.1. DNS-fragmentáció hatása a spermium funkcionális paramétereire

A sperma analízis alapvető vizsgálata a férfi meddőség diagnosztizálásához. A hagyományos sperma analízis során elsősorban a mikroszkóp alatt vizsgálható sejtulajdonságok kiértékelése történik, ide tartozik a vitalitás, motilitás, morfológia és egyéb paraméterek (K. Liu et al., 2023). Ezek a paraméterek segítenek a férfiak termékenysége kiértékelésében (Agarwal & Allamaneni, 2005). Ezeknek a rutinvizsgálatoknak azonban megvannak a maguk korlátai a klinikai alkalmazásban. A sperma analízis nem minden esetben adja meg a pontos értékeket a férfiak termékenysége megfelelő felméréséhez, ugyanis egyes statisztikai elemzések szerint a meddő férfiak körülbelül 15%-a mutatott normális paramétereket (Carrell et al., 2006). Ez azt sugallja, hogy a spermavizsgálat önmagában csak korlátozott információt nyújt a férfi termékenység értékeléséhez, és nem tükrözi teljes mértékben a spermiumok megtermékenyítési potenciálját (K. Liu et al., 2023). A reprodukciós gyógyászat fejlődésének köszönhetően úgy vélik, hogy a spermium DNS-fragmentációja (SDF) a hímivarsejtekben történik a spermatogenezis és az érési folyamatok során, ez pedig tükrözi a DNS integritását, valamint károsodását (Campos et al., 2021). A spermium kromatinjának károsodása közvetlenül befolyásolhatja a normális élettani funkciókat, valamint hibás genetikai információ átadásához vezethet az utódok esetében. A DFI olyan paraméter, amely segít a férfi termékenység értékelésében (Zhang et al., 2021). Manapság a spermium DFI meghatározása kiegészítő vizsgálattá vált a funkcionális paraméterek meghatározása során, ugyanis az alacsonyabb teherbeesési arányt okozhatja a megnövekedett DNS-fragmentáció is (López et al., 2013). A konvencionális sperma paraméterek és a hormonszintek mellett a DNS-fragmentáció vizsgálata átfogó képet adhat a páciens spermiumainak állapotáról, azok mozgékonyságáról, morfológiájáról, életképességéről, a genetikai anyag hibájának mértékéről és a kiegészítő gonadális szekréciós funkcióról, amely fontos irányadó jelentőséggel bír a meddőség diagnosztizálásában és kezelésében (Agarwal et al., 2016).

Egy kutatás során 2008-2013 között minden termékenységi vizsgálatra jelentkezett férfi sperma mintáját elemezték, főként az életképesség és a DNS-fragmentáció szempontjából. Ez egy retrospektív elemzés volt, melynek során összesen 2695 férfi adatait gyűjtötték össze (Samplaski et al., 2015). A tanulmány során összesen 3049 sperma mintát vizsgáltak, melyek közül 47 (1,5%) minta vitalitása 0-20% között volt, 113 (3,7%) minta életképessége 21-40%, 450 (14,8%) minta életképessége 41-60%, 1920 (63%) minta életképessége 61-80%, és 519 (17%) minta életképessége 81-100% volt. A vizsgálat eredményei kimutatták, hogy a magasabb spermium DNS-fragmentációs arányok az alacsonyabb életképességgel álltak összefüggésben, emellett azok a minták, melyek a legalacsonyabb vitalitással rendelkeztek (0-20%), a legmagasabb DNS-fragmentációs értékkel is egyaránt ($70,07 \pm 34,39\%$) (Samplaski et al., 2015). Azok a minták, amelyeknél a legmagasabb volt a vitalitási érték (81-100%), a legalacsonyabb spermium DNS-fragmentációs arányokkal voltak összefüggésben ($12,40 \pm 5,61\%$). 433 minta (16,1%) esetében a spermiumok életképessége $\leq 58\%$ volt, ami a 2010-es WHO laboratóriumi kézikönyv irányelvei szerint a normális alsó határ (Samplaski et al., 2015). Ezeknél a mintáknál a DNS-fragmentáció átlagos értéke $48,65 \pm 25,59\%$ volt. Azok a minták, ahol az életképesség $> 58\%$ (2262 minta), a DNS-fragmentáció átlagos értéke $19,57 \pm 10,58\%$ volt ($p < 0,001$). Erős inverz kapcsolatot figyeltek meg a spermiumok életképessége és a DNS-fragmentáció között ($p < 0,001$), a Pearson-féle korrelációs együttható $r = -0,83$, $t = -80,69$, $df = 3047$, $p < 0,001$ és a 95%-os megbízhatósági intervallum $-0,836$ és $-0,814$ között volt (Zini et al., 2008b). Abban az esetben amikor az életképesség értéke nagyon magas volt ($\geq 80\%$, $n =$

1104), akkor a DNS-fragmentáció kisebb volt, mint 30% (100% -os érzékenység a DNS-fragmentáció előrejelzésére <30%). Azoknál a mintáknál, ahol az életképesség nagyon alacsony volt (életképesség $\leq 35\%$, $n = 91$), a DFI mindig $\geq 30\%$ volt. Ha az életképesség $\leq 50\%$ volt, akkor a DNS-fragmentáció $\geq 30\%$ volt a minták 95%-ánál ($n = 310$) (Cohen-Bacrie et al., 2009).

A vizsgálatok és eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy egyértelműen kapcsolat van a DNS-fragmentáció és a spermium életképessége között (Brahem et al., 2012). Emellett DNS-fragmentáció az érett, életképes spermiumokban is megfigyelhető, bár a folyamatot kiváltó okokat még nem tárták fel teljes mértékben. Az eredmények alapján azon férfiak esetében, akiknek a spermium életképessége $\geq 75\%$, a DNS-fragmentációs teszt valószínűleg nem nyújt további információt, mivel ezeknél a férfiaknál a spermium DNS-fragmentáció feltehetőleg alacsony (Samplaski et al., 2015).

5.2. Különböző spermium feldolgozási technikák hatása a vitalitásra, motilitásra, DNS-fragmentációra

A férfiak termékenysége és az asszisztált reprodukciós eljárások, különösen az IUI sikere összefügg a spermiumok túlélésével. A spermiumok életképessége a méhben, és megfelelő mozgékonyaságuk a női reproduktív traktusban a sikeres megtermékenyítés legfontosabb tényezői. (Suarez & Pacey, 2006). A spermium túlélési tesztet a spermiumok mozgékonyaságának és túlélésének mérésére használják az ejakulációt követő 24 órában, miután a SU és a DGC megtörtént. Egyre több tanulmányban mutatták ki, hogy a különböző feldolgozási módszerek milyen hatással voltak a molekuláris markerekre, például a DFI-re, a spermium telomerekre, motilitásra (Zini et al., 2000). Emellett több kutatás is kimutatta, hogy a SU technika esetében alacsonyabb lett a DNS-fragmentációs arány, amikor friss mintákat vizsgáltak, míg a DGC esetén nem ezt az eredményt tapasztalták. Azonban ezzel szemben egy másik kutatás során megfigyelték, hogy a DFI csökkent a DGC-t követően, kivéve súlyos oligozoospermia esetén (Le et al., 2022). Továbbá mind a SU, mind a DGC bizonyítottan csökkent a spermiumok morfológiai deformitását, az eredmények alapján pedig a DGC hatékonyabban csökkenti a DNS-fragmentációt (Xue et al., 2014). A különböző spermium-előkészítési eljárások hatása a spermiumok működésére továbbra sem ismert. Ebben a tanulmányban meghatározták, hogyan befolyásolja a DGC és SU technika a spermiumok túlélését és a DFI-t. A vizsgálat során összesen 63 spermiummintát dolgoztak fel. Összesen 20 minta (31,7%) esetén voltak normál spermiumjellemzők, míg a többi 43 mintánál (68,3%) legalább egy rendellenes jellemző volt megfigyelhető (Le et al., 2022). Az átlagos progresszív mozgékonyaság aránya $31,32\% \pm 6,90\%$ volt, a morfológiailag normális spermiumok aránya 58,7%, míg az átlagos DFI érték $27,25\% \pm 18,98\%$ volt. A 0. órában megfigyelt minták esetén a spermium életképességének és progresszív mozgékonyaságának átlagos aránya szignifikánsan magasabb volt a SU eljárás esetén, mint a DGC-nél ($95,70\% \pm 3,09\%$ vs. $90,90\% \pm 4,61\%$, illetve $90,63\% \pm 4,36\%$ vs. $85,11\% \pm 5,22\%$; $p < 0,05$). Azonban 24 óra elteltével a DGC csoport szignifikánsan magasabb spermium életképességet ($66,16\% \pm 15,65\%$) és progresszív mozgékonyaságot ($57,25\% \pm 19,82\%$) mutatott, mint a SU csoport ($p < 0,05$) (Le et al., 2022). A DFI elemzése során, melynél 45 normál DFI-vel rendelkező mintát (DFI $< 30\%$) és 18 rendellenes DFI-vel rendelkező mintát (DFI $\geq 30\%$) vizsgáltak, azt mutatta, hogy a normál DFI-vel rendelkező résztvevők körében az SU eljárás szignifikánsan alacsonyabb DFI értéket eredményezett, mint a DGC módszer ($5,33\% \pm 4,17\%$ vs. $8,28\% \pm 4,76\%$; $p < 0,001$). A DFI mind a SU, mind pedig a DGC-t követően csökkent. A rendellenes DFI-vel rendelkező

résztvevők körében a két technika közötti DFI különbség statisztikailag nem volt jelentős. A SU technika szignifikánsan kisebb mértékű DFI csökkenést eredményezett a spermiumok progresszív mozgékonyasága és morfológiája vizsgálata során, mint a DGC (Le et al., 2022).

Vizsgálataink során hasonló eredményeket kaptunk, mint az említett tanulmányokban. A natív ondómintában a DNS-fragmentáció ($39,64\% \pm 12,67\%$) volt, míg DGC és SU eljárást követően ezek az értékek csökkentek (DGC: $33,90\% \pm 12,11\%$), (SU: $10,14\% \pm 1,61\%$). Emellett a vitalitási és motilitási értékek pedig növekedtek. A natív mintában a vitalitási érték ($58,65\% \pm 13,64\%$) volt, míg DGC után: ($66,21\% \pm 10,11\%$) és SU után: ($86,39\% \pm 5,62\%$). A natív mintában a motilitási érték ($17,96\% \pm 9,22\%$) volt, DGC-t követően ($37,95\% \pm 10,38\%$) és SU után ($66,29\% \pm 8,60\%$). Eredményeink alapján elmondható, hogy mind a két feldolgozási technika javította a vizsgált paramétereket. (4. ábra)

Továbbá egy másik kutatás során olyan párokat vizsgáltak, akik ART eljáráson vettek részt, a spermiumok feldolgozása MACS-szel történt, majd a kapott eredményeket összehasonlították másik két módszerrel (SU, DGC) feldolgozott spermiumok eredményeivel (Gil et al., 2013a). 5 tanulmányt választottak ki, így összesen 499 páciens ondómintáját vizsgálták. Ezek közül 278 spermiummintát MACS eljárással dolgoztak fel (vizsgált csoport), míg 221 mintát DGC vagy SU technikával készítettek elő (kontrollcsoport). A tanulmány kimutatta, hogy a MACS hatékonyan csökkenti a spermium DNS-fragmentációját, és megfelelő az apoptotikus spermiumok szelektálására is (Gil et al., 2013b). Ez a feldolgozási technika javítja a spermium minőségét és funkcionalitását mivel a MACS pozitív hatással volt a spermiumok mozgékonyaságára, valamint morfológiájára, melyeket a spermium deformitási index segítségével mértek (de Vantéry Arrighi et al., 2009; Paasch et al., 2003; Said & Land, 2011). Másik kutatás során 10 páciens spermiummintáját vizsgálták, mindegyik minta esetében magas volt a DF értéke. A vizsgálat során kimutatták, hogy a DF minden esetben csökkent a MACS eljárást követően, emellett pedig a spermiumok motilitása és vitalitása 6%-kal növekedett a feldolgozási technika után (Rawe et al., 2009).

Kutatásunk során hasonló eredményeket kaptunk, mint a fentebb említett tanulmányokban. A natív ondómintában a DF értéke: ($39,64\% \pm 12,67\%$) volt, míg MACS-et követően lecsökkent a következő értékre: ($19,38\% \pm 11,55\%$). Emellett mi is vizsgáltuk a vitalitásra és motilitásra gyakorolt hatását. A natív mintában a vitalitási érték ($58,65\% \pm 13,64\%$) volt, míg MACS után ez az érték növekedett: ($72,54\% \pm 6,09\%$). A mozgékonyaság vizsgálata során ugyanezt a növekedést tapasztaltuk. A natív mintában a motilitás ($17,96\% \pm 9,22\%$) volt, MACS után pedig a következő értéket kaptuk: ($46,33\% \pm 8,58\%$). Ezek alapján elmondható, hogy a MACS is hatékonyan csökkenti a DFI-t. (4. ábra)

Vannak kutatások további kiválasztási technikákra is, ebben a tanulmányban egyszerű, költséghatékony és centrifugálásmentes mikrofluidikai eszközt mutatnak be, amely a reotaxist, vagy a mozgékony spermiumok áramlással szembeni mozgását kihasználva szelektálja az egészséges spermiumokat (Ataei et al., 2021). Mikrofluidikai spermium-szelektáló eszközre konkrét példa egy olyan chip, amely a spermiumokat polikarbonát membrán pórusain történő áthaladásuk alapján választja ki, ahol a pórusméretek 3 és 8 μm között vannak (Asghar et al., 2014). A kísérleteket három különböző áramlási sebességgel végezték (az áramlás iránya az eszköz felső kamrájától az alsó kamrája felé mutatott): (1) Áramlás nélkül (kontroll), (2) 25 $\mu\text{l/perc}$ és (3) 50 $\mu\text{l/perc}$ áramlási sebességgel. A spermiumok motilitása a kontroll csoportban (áramlás nélküli) egyértelműen alacsonyabb, míg a 25 $\mu\text{l/perc}$ és 50 $\mu\text{l/perc}$ áramlási sebességgel válogatott minták esetében ($93,75\% \pm 3,05\%$), ($99,46\% \pm 0,92\%$) és ($99,2\% \pm 1,38\%$) volt a motilitás. Ezeket a motilitási értékeket összehasonlították a tárolt minták motilitási értékével, amely $39,12\% (\pm 4,62\%)$ volt, ez alapján szignifikáns növekedést figyeltek

meg a kiválasztott motilis spermiumok százalékos arányában (Ataei et al., 2021). Arra a következtetésre jutottak, hogy ez a növekedés annak köszönhető, hogy elsősorban a jó minőségű, mozgékony spermiumok képesek ellenállni az áramlásnak és nem zavarja őket az úzásban, míg a rosszabb mozgékonyaságú spermiumok nem képesek ellenállni, így az áramlással együtt a kamra alsó felére kerülnek. Emellett nézték a DNS-fragmentációra gyakorolt hatását is (Ataei et al., 2021). A DFI (%) értékek a következők voltak: $24 \pm 2,33\%$ (tárolt minta), $0, 25$ és $50 \mu\text{l/perc}$ áramlási sebességgel ennek megfelelő sorrendben $20\% \pm 1,44\%$, $6\% \pm 0,45\%$ és $44\% \pm 1,66\%$. Alacsonyabb DF értéket kaptak a válogatott spermiumoknál, kivéve az $50 \mu\text{l/perc}$ áramlási sebesség esetén. Arra jutottak, hogy az $50 \mu\text{l/perc}$ áramlási sebesség elég magas ahhoz, hogy olyan nyíróerőt hozzon létre, amely fizikailag károsítja a spermium DNS-ét (Aitken et al., 2010). A vizsgálat kimutatta, hogy ez a chip képes volt hatékonyan kiszelektálni az életképesebb spermiumokat, csökkentette a DF értéket, valamint magasabb DNS integritást mutatott a válogatott spermiumoknál (Asghar et al., 2014).

Vizsgálatunk során a Zymot Fertile chip hatását vizsgáltuk a DF-re, motilitásra és vitalitásra. Mindegyik vizsgált paraméter során javuló tendenciát tapasztaltunk. A DF értékét lényegesen lecsökkentette. A natív minta DF értéke $39,64\% \pm 12,67\%$ volt, míg az eljárást követően a következő eredményt kaptuk: $3,68\% \pm 1,84\%$. A motilitásra és vitalitásra gyakorolt hatását is megfigyeltük, melynek során azt tapasztaltuk, hogy ezek az értékek növekedtek. A natív mintában a vitalitás $58,65\% \pm 13,64\%$ volt, a szelekciós technika után a következő értéket kaptuk: $96,9\% \pm 1,42\%$, valamint a motilitási érték a natív mintában $17,96\% \pm 9,22$ volt és a chip alkalmazása után a következőt kaptuk: $94,36\% \pm 2,62\%$. Eredményeink alapján elmondható, hogy a chip technológia hatékony módja a DF csökkentésének, és emellett pozitív hatással van a mozgékonyaságra és ezáltal az életképességre. (4. ábra)

5.3. Élő spermiumok szelekciójának hatása a DNS-fragmentációra

A spermatogenezis folyamatának minőségét spermiumanalízis során értékelik, melynek során meghatározzák a spermiumok fő paramétereit, mint például koncentráció, spermiumok száma, mozgékonyasága, valamint morfológiája. Ez a teszt alapvető fontosságú a férfi meddőség diagnosztizálása során, azonban a természetes úton való fogantatás előrejelzésére nem a legalkalmasabb (Leushuis et al., 2014). A fogantatás sikertelensége olyan apróbb spermiumszerkezeti vagy funkcióbeli hibákon múlhat, melyet ez a rutinvizsgálat nem képes kimutatni. Számos kutatás folyt annak kapcsán, hogy az SDF milyen hatással lehet a termékenységre. Arra jutottak, hogy képes lehet előrejelezni a természetes fogantatás sikerét, ugyanis, ha a szintje meghaladja a küszöbértéket, a teherbeesésre való siker csökken (Ribas-Maynou et al., 2013). Több laboratórium is hozzáadta az ondóvizsgálathoz az SDF kimutatására irányuló teszteket. Az SDF hatása túlmutathat a tényleges DNS-töréseken az úgynevezett „jéghegy csúcsának elmélete” szerint (EVENSON et al., 2002). Az elmélet szerint a kimutatott SDF csak kisebb része egy kiterjedtebb rendellenességnek a spermiumpopulációban, amely hatással lehet a reprodukcióra. Az SDF-hez kapcsolódó rejtett rendellenességekkel rendelkező sejtek valószínűleg azok, amelyekben nyilvánvaló DNS-törés alakul ki, amikor az ejakulált spermiumokat káros hatásnak vannak kitéve, például in vitro inkubációnak vagy spermiumszelekciónak (Santiso et al., 2012). A szakemberek arra számítottak, hogy az adott körülmények között minden alany hasonló károsodást szenved el, azonban a kialakult károsodás mértéke változó az egyének között és változatosabb, mint az SDF alapértéke (azaz inkubáció előtt). Arra jutottak, hogy ez nagyban függhet a már említett rejtett rendellenességektől.

miatt kialakult sérülések mértékétől (Casamonti et al., 2017). Egyes szerzők „rejtélyes” vagy „látens” spermiumkárosodásnak nevezték az inkubáció során kialakult DNS-fragmentáció mértékét (García-Peiró et al., 2011). Az SDF-fel kapcsolatos kutatások kimutatták, hogy egyetlen paraméter meghatározása a natív ondómintában, segít elkülöníteni a termékeny és terméketlen férfiakat (Sergeie et al., 2005). Az asszisztált reprodukciós gyakorlatban a jéghegy csúcsa elmélet arra is magyarázattal szolgálhat, hogy egyes tanulmányokban megfigyelték, a natív ondómintában kimutatott SDF hatással van a reprodukív kimenetelre, míg elméletileg az a spermiumpopuláció lenne a megfelelő az SDF tesztelésére, amelyet az oocita inseminációra választanak ki (Mitchell et al., 2011). A natív SDF mennyisége és a válogatott spermiumokban található SDF mennyisége közötti kapcsolat komplex és az egyéntől függ. A klinikai gyakorlatban a spermiumok feldolgozása elsősorban DGC vagy SU eljárásokkal történik, ezek során a legtöbb, nem életképes, DNS-fragmentált spermiumot eltávolítják, ezzel csökkentve az SDF-et a válogatott spermiummintában (Conti et al., 2024). Az életképes spermiumok kiválasztása már önmagában csökkentheti az SDF-et. Egy natív ondómintában a magas DF érték az életképtelen spermiumokból származik, míg ezzel szemben a válogatott populációban ennek ellenkezője figyelhető meg (Casamonti et al., 2017). A magas SDF-értékkel rendelkező kiválasztott minták (a szelekció során megnövekedett DF miatt) hasonló alap (azaz szelekció előtti) SDF-értékeket mutatnak, mint azok a válogatott minták, amelyek alacsony SDF-vel rendelkeznek (a szelekció során bekövetkező DNS-törés csökkenése miatt) (Santi et al., 2018).

Megfigyelték, hogy amikor a válogatott populációban magas volt a DF, később 50%-kal alacsonyabb volt a terhességi arány azokhoz képest, akiknél csökkentették az eljárások során a DF-et. Sajnos kevés tanulmány hasonlította össze az SDF-t a natív és a válogatott spermiummintákban asszisztált reprodukció esetén. Emellett ezek az eredmények ellentmondásosak, arra következtettek, hogy attól függ az eredmény, melyik tesztet használták a DF kimutatására. Ezekből a vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy az SDF kimutatása egy kiválasztott spermiumpopulációban jobban megjósolhatja az ART-ban résztvevő párok teherbeesésének esélyét (Conti et al., 2024). Az élő és mozgó spermiumok kiemelése közvetlenül javítja a minőséget, hiszen az alacsonyabb DFI az életképesebb spermiumokkal van összefüggésben. Végző soron ez felveti azt a kérdést, hogy egyáltalán szükség van-e további szelekciós eljárásokra, ha az élő, mozgó spermiumok természetesen alacsonyabb DFI-vel rendelkeznek.

6. Irodalomjegyzék

- Abdelazim, I. A., Purohit, P., Farag, R. H., & Zhurabekova, G. (2018). Unexplained infertility: prevalence, possible causes and treatment options. A review of the literature. *Journal of Obstetrics and Gynecological Investigations*, 1(1), 17–22.
<https://doi.org/10.5114/jogi.2018.74250>
- Aboulghar, M. A., Mansour, R. T., Serour, G. I., & Al-Inany, H. G. (2003). Diagnosis and management of unexplained infertility: an update. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 267(4), 177–188. <https://doi.org/10.1007/s00404-002-0300-0>
- Adler, M. W. (1996). Sexually transmitted diseases control in developing countries. *Sexually Transmitted Infections*, 72(2), 83–88. <https://doi.org/10.1136/sti.72.2.83>
- Agarwal, A., & Allamaneni, S. S. R. (2005). Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertility and Sterility*, 84(4), 850–853.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.080>
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C.-L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021a). Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319–333.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C.-L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021b). Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), 319–333.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., & Esteves, S. (2016). Varicocele and male infertility: current concepts and future perspectives. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 161. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.172819>
- Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 5(6), 935–950.
<https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>
- Agic, A., Xu, H., Finas, D., Banz, C., Diedrich, K., & Hornung, D. (2006). Is Endometriosis Associated with Systemic Subclinical Inflammation? *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 62(3), 139–147. <https://doi.org/10.1159/000093121>
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), 727–733.
[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60676-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60676-1)
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., Hedges, A., & McLachlan, R. I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 25(10), 2415–2426. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq214>
- Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z., & Irvine, D. S. (1998). Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59(5), 1037–1046.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1037>

- Alshahrani, S., Ahmed, A.-F., Gabr, A. H., Abalhassan, M., & Ahmad, G. (2016). The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia*, 48(10), 1125–1129. <https://doi.org/10.1111/and.12549>
- Andrabi, S. W., Ara, A., Saharan, A., Jaffar, M., Gugnani, N., & Esteves, S. C. (2024). Sperm DNA Fragmentation: causes, evaluation and management in male infertility. *JBRA Assisted Reproduction*. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20230076>
- Asero, P., Calogero, A. E., Condorelli, R. A., Mongioi', L., Vicari, E., Lanzafame, F., Crisci, R., & La Vignera, S. (2014). Relevance of genetic investigation in male infertility. *Journal of Endocrinological Investigation*, 37(5), 415–427. <https://doi.org/10.1007/s40618-014-0053-1>
- Asghar, W., Velasco, V., Kingsley, J. L., Shoukat, M. S., Shafiee, H., Anchan, R. M., Mutter, G. L., Tüzel, E., & Demirci, U. (2014). Selection of Functional Human Sperm with Higher DNA Integrity and Fewer Reactive Oxygen Species. *Advanced Healthcare Materials*, 3(10), 1671–1679. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400058>
- Ataei, A., Lau, A. W. C., & Asghar, W. (2021). A microfluidic sperm-sorting device based on rheotaxis effect. *Microfluidics and Nanofluidics*, 25(6), 52. <https://doi.org/10.1007/s10404-021-02453-8>
- Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S., & Saunders, P. T. K. (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, 129(4), 505–514. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00531>
- Bellver, J., Meseguer, M., Muriel, L., Garcia-Herrero, S., Barreto, M. A. M., Garda, A. L., Remohi, J., Pellicer, A., & Garrido, N. (2010). Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Human Reproduction*, 25(7), 1713–1721. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq098>
- Bhattacharya, S. M. (2008). Association of various sperm parameters with unexplained repeated early pregnancy loss—which is most important? *International Urology and Nephrology*, 40(2), 391–395. <https://doi.org/10.1007/s11255-007-9282-y>
- Bianchi, P. G., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Bianchi, U., & Sakkas, D. (1993). Effect of Deoxyribonucleic Acid Protamination on Fluorochrome Staining and in Situ Nick-Translation of Murine and Human Mature Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*, 49(5), 1083–1088. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.5.1083>
- Boeri, L., Capogrosso, P., Ventimiglia, E., Pederzoli, F., Frego, N., Cazzaniga, W., Chierigo, F., Alfano, M., Piemonti, L., Viganò, P., Pontillo, M., Montanari, E., Montorsi, F., & Salonia, A. (2019). Undiagnosed prediabetes is highly prevalent in primary infertile men – results from a cross-sectional study. *BJU International*, 123(6), 1070–1077. <https://doi.org/10.1111/bju.14558>
- Brahem, S., Jellad, S., Ibala, S., Saad, A., & Mehdi, M. (2012). DNA fragmentation status in patients with necrozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(6), 319–323. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.710869>

- Bricker, L. (2002). Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice. *Human Reproduction*, 17(5), 1345–1350. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1345>
- Britan, A., Maffre, V., Tone, S., & Drevet, J. R. (2006). Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell and Tissue Research*, 324(2), 301–310. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0151-7>
- Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2001). Definition and causes of infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 2(1), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62193-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62193-1)
- Bungum, M. (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction*, 19(6), 1401–1408. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh280>
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., & Giwercman, A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*, 22(1), 174–179. <https://doi.org/10.1093/humrep/del326>
- Burrello, N., Arcidiacono, G., Vicari, E., Asero, P., Di Benedetto, D., De Palma, A., Romeo, R., D'Agata, R., & Calogero, A. E. (2004). Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human Reproduction*, 19(10), 2298–2302. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh438>
- Campos, L. G. A., Requejo, L. C., Miñano, C. A. R., Orrego, J. D., Loyaga, E. C., & Cornejo, L. G. (2021). Correlation between sperm DNA fragmentation index and semen parameters in 418 men seen at a fertility center. *JBRA Assisted Reproduction*. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200079>
- Carrell, D. T., De Jonge, C., & Lamb, D. J. (2006). THE GENETICS OF MALE INFERTILITY: A FIELD OF STUDY WHOSE TIME IS NOW. *Archives of Andrology*, 52(4), 269–274. <https://doi.org/10.1080/01485010500503603>
- CARRELL, D. T., LIU, L., PETERSON, C. M., JONES, K. P., HATASAKA, H. H., ERICKSON, L., & CAMPBELL, B. (2003). SPERM DNA FRAGMENTATION IS INCREASED IN COUPLES WITH UNEXPLAINED RECURRENT PREGNANCY LOSS. *Archives of Andrology*, 49(1), 49–55. <https://doi.org/10.1080/01485010290099390>
- Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and Management of Infertility. *JAMA*, 326(1), 65. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788>
- Casamonti, E., Vinci, S., Serra, E., Fino, M. G., Brilli, S., Lotti, F., Maggi, M., Coccia, M. E., Forti, G., & Krausz, C. (2017). Short-term <scp>FSH</scp> treatment and sperm maturation: a prospective study in idiopathic infertile men. *Andrology*, 5(3), 414–422. <https://doi.org/10.1111/andr.12333>
- Cohen-Bacrie, P., Belloc, S., Ménézo, Y. J. R., Clement, P., Hamidi, J., & Benkhalifa, M. (2009). Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of

- 1,633 patients. *Fertility and Sterility*, 91(5), 1801–1805.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.086>
- Conti, D., Calamai, C., & Muratori, M. (2024). Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility: Tests, Mechanisms, Meaning and Sperm Population to Be Tested. *Journal of Clinical Medicine*, 13(17), 5309. <https://doi.org/10.3390/jcm13175309>
- Coughlan, C., Clarke, H., Cutting, R., Saxton, J., Waite, S., Ledger, W., Li, T., & Pacey, A. (2015). Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 681. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.144946>
- Crosignani, P. G., Collins, J., Cooke, I. D., Diezfallus, E., & Rubin, B. (1993). Unexplained infertility. *Human Reproduction*, 8(6), 977–980.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138177>
- de Vantéry Arrighi, C., Lucas, H., Chardonens, D., & de Agostini, A. (2009). Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-1>
- Enciso, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2009). A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(5), 609–616. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60003-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60003-X)
- EVENSON, D. P., LARSON, K. L., & JOST, L. K. (2002). Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*, 23(1), 25–43.
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2008a). Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay–derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1229–1231.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.066>
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2008b). Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay–derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1229–1231.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.066>
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2008c). Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay–derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1229–1231.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.066>
- Evers, J. L. (2002). Female subfertility. *The Lancet*, 360(9327), 151–159.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09417-5)
- Evers, J. L., de Haas, H. W., Land, J. A., Dumoulin, J. C., & Dunselman, G. A. (1998). Treatment-independent pregnancy rate in patients with severe reproductive disorders. *Human Reproduction*, 13(5), 1206–1209. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.5.1206>

- Gandini, L. (2004). Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reproduction*, 19(6), 1409–1417. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh233>
- García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M. J., Navarro, J., Jones, C., Coward, K., Gosálvez, J., & Benet, J. (2011). Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertility and Sterility*, 95(1), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.053>
- Gelbaya, T. A., Potdar, N., Jeve, Y. B., & Nardo, L. G. (2014). Definition and Epidemiology of Unexplained Infertility. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(2), 109–115. <https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000043>
- Gil, M., Sar-Shalom, V., Melendez Sivira, Y., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013a). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(4), 479–485. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9962-8>
- Gil, M., Sar-Shalom, V., Melendez Sivira, Y., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013b). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(4), 479–485. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9962-8>
- Giles, D. E., & Berga, S. L. (1993). Cognitive and psychiatric correlates of functional hypothalamic amenorrhea: a controlled comparison. *Fertility and Sterility*, 60(3), 486–492. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56165-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56165-2)
- Gil-Villa, A. M., Cardona-Maya, W., Agarwal, A., Sharma, R., & Cadavid, Á. (2010). Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 94(4), 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.042>
- Giudice, L. C., & Kao, L. C. (2004). Endometriosis. *The Lancet*, 364(9447), 1789–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17403-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17403-5)
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Franco, G., Anniballo, N., Mendoza, C., & Tesarik, J. (2005a). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction*, 20(1), 226–230. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh590>
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Franco, G., Anniballo, N., Mendoza, C., & Tesarik, J. (2005b). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction*, 20(1), 226–230. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh590>
- Guzick, D. S., Grefenstette, I., Baffone, K., Berga, S. L., Krasnow, J. S., Stovall, D. W., & Naus, G. J. (1994). Infertility: Infertility evaluation in fertile women: a model for assessing the efficacy of infertility testing. *Human Reproduction*, 9(12), 2306–2310. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138442>

- Guzick, D., Sullivan, M., Adamson, G. D., Cedars, M., Falk, R., Peterson, E., & Steinkampf, M. (1998). Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 70(2), 207–213. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00177-0)
- Hamamah, S. (1997). The effect of male factors in repeated spontaneous abortion: lesson from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction Update*, 3(4), 393–400. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.4.393>
- Hassan, M. A. M., & Killick, S. R. (2003). Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertility and Sterility*, 79, 1520–1527. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00366-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00366-2)
- Hassan, M. A. M., & Killick, S. R. (2004). Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertility and Sterility*, 81(2), 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.06.027>
- Healy, D. L., Trounson, A. O., & Andersen, A. N. (1994). Female infertility: causes and treatment. *The Lancet*, 343(8912), 1539–1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92941-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92941-6)
- Homan, G. F., Davies, M., & Norman, R. (2007). The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Human Reproduction Update*, 13(3), 209–223. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml056>
- Houston, B. J., Conrad, D. F., & O'Bryan, M. K. (2021). A framework for high-resolution phenotyping of candidate male infertility mutants: from human to mouse. *Human Genetics*, 140(1), 155–182. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02159-x>
- Hughes, E., Brown, J., Collins, J. J., & Vanderkerchove, P. (2010). Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000057.pub2>
- Hull, M. G., Glazener, C. M., Kelly, N. J., Conway, D. I., Foster, P. A., Hinton, R. A., Coulson, C., Lambert, P. A., Watt, E. M., & Desai, K. M. (1985). Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *BMJ*, 291(6510), 1693–1697. <https://doi.org/10.1136/bmj.291.6510.1693>
- Hwang, J. Y., Nawaz, S., Choi, J., Wang, H., Hussain, S., Nawaz, M., Lopez-Giraldez, F., Jeong, K., Dong, W., Oh, J.-N., Bilguvar, K., Mane, S., Lee, C.-K., Bystroff, C., Lifton, R. P., Ahmad, W., & Chung, J.-J. (2021). Genetic Defects in DNAH2 Underlie Male Infertility With Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella in Humans and Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662903>
- Jensen, T. K., Slama, R., Ducot, B., Suominen, J., Cawood, E. H. H., Andersen, A. G., Eustache, F., Irvine, S., Auger, S., Jouannet, P., Vierula, M., Jørgensen, N., Toppari, J., Skakkebaek, N. E., Keiding, N., & Spira, A. (2001). Regional differences in waiting time to pregnancy among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*, 16(12), 2697–2704. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.12.2697>

- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. (2012). European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Urology*, 62(2), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, 15(6), 369–384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
- Le, M. T., Dang, H. N. T., Nguyen, T. Van, Nguyen, T. T. T., Nguyen, Q. H. V., & Cao, N. T. (2022). Effects of sperm preparation techniques on sperm survivability and DNA fragmentation. *Journal of International Medical Research*, 50(5). <https://doi.org/10.1177/03000605221097492>
- Leaver, R. B. (2016). Male infertility: an overview of causes and treatment options. *British Journal of Nursing*, 25(18), S35–S40. <https://doi.org/10.12968/bjon.2016.25.18.S35>
- Leushuis, E., van der Steeg, J. W., Steures, P., Repping, S., Bossuyt, P. M. M., Mol, B. W. J., Hompes, P. G. A., & van der Veen, F. (2014). Semen analysis and prediction of natural conception. *Human Reproduction*, 29(7), 1360–1367. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu082>
- Liu, J. L., Peña, V., Fletcher, S. A., & Kohn, T. P. (2020). Genetic testing in male infertility – reassessing screening thresholds. *Current Opinion in Urology*, 30(3), 317–323. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000764>
- Liu, K., Mao, X., Pan, F., Chen, Y., & An, R. (2023). Correlation analysis of sperm DNA fragmentation index with semen parameters and the effect of sperm DFI on outcomes of ART. *Scientific Reports*, 13(1), 2717. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28765-z>
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. G., & Casper, R. F. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13(4), 896–900. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.896>
- Lopes, S., Sun, J.-G., Jurisicova, A., Meriano, J., & Casper, R. F. (1998). Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation is Increased in Poor-Quality Semen Samples and Correlates with Failed Fertilization in Intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertility and Sterility*, 69(3), 528–532. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00536-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00536-0)
- López, G., Lafuente, R., Checa, M. A., Carreras, R., & Brassesco, M. (2013). Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment. *Asian Journal of Andrology*, 15(6), 790–794. <https://doi.org/10.1038/aja.2013.81>
- López-Botella, A., Velasco, I., Acién, M., Sáez-Espinosa, P., Todolí-Torró, J.-L., Sánchez-Romero, R., & Gómez-Torres, M. J. (2021). Impact of Heavy Metals on Human Male Fertility—An Overview. *Antioxidants*, 10(9), 1473. <https://doi.org/10.3390/antiox10091473>
- Ma, Y., He, X., Qi, K., Wang, T., Qi, Y., Cui, L., Wang, F., & Song, M. (2019). Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. *Journal of Environmental Sciences*, 77, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.07.015>

- Makar, R. S., & Toth, T. L. (2002). The Evaluation of Infertility. *Pathology Patterns Reviews*, 117(suppl_1), S95–S103. <https://doi.org/10.1309/W8LJ-K377-DHRA-CP0B>
- Manouchehri, A., Shokri, , Samira, Pirhadi, M., Karimi, M., Abbaszadeh, S., Mirzaei, G., & Bahmani, M. (2022). The Effects of Toxic Heavy Metals Lead, Cadmium and Copper on the Epidemiology of Male and Female Infertility. *JBRA Assisted Reproduction*. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220013>
- McPherson, S. M. G., & Longo, F. J. (1993). Nicking of Rat Spermatid and Spermatozoa DNA: Possible Involvement of DNA Topoisomerase II. *Developmental Biology*, 158(1), 122–130. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1173>
- McPherson, S. M., & Longo, F. J. (1992). Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: Stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molecular Reproduction and Development*, 31(4), 268–279. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310408>
- Mitchell, L. A., De Iuliis, G. N., & Aitken, R. J. (2011). The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *International Journal of Andrology*, 34(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01042.x>
- Morris, I. D. (2002a). Sperm DNA damage and cancer treatment ¹. *International Journal of Andrology*, 25(5), 255–261. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2002.00372.x>
- Morris, I. D. (2002b). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 17(4), 990–998. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.4.990>
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research*, 256(1), 12–18. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4834>
- Nugent, D., Watson, A. J., Killick, S. R., Balen, A. H., & Rutherford, A. J. (2002). A randomized controlled trial of tubal flushing with lipiodol for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 77(1), 173–175. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02925-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02925-9)
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A. J., & Alvarez, J. G. (2001a). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction*, 16(9), 1912–1921. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1912>
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A. J., & Alvarez, J. G. (2001b). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction*, 16(9), 1912–1921. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1912>
- Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P. (2008a). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reproduction Update*, 14(6), 605–621. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn042>

- Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P. (2008b). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human Reproduction Update*, 14(6), 605–621. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn042>
- Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G., & Glander, H. (2003). Deterioration of Plasma Membrane Is Associated With Activated Caspases in Human Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(2), 246–252. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02669.x>
- Pellati, D., Mylonakis, I., Bertoloni, G., Fiore, C., Andrisani, A., Ambrosini, G., & Armanini, D. (2008). Genital tract infections and infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 140(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.03.009>
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., & Dunkel, L. (1999). Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 276(2), E310–E316. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.2.E310>
- Petraglia, F., Serour, G. I., & Chapron, C. (2013). The changing prevalence of infertility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 123(S2). <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.09.005>
- Rao, K. L., Babu, K. A., Kanakavalli, M., Padmalatha, V., Deenadayal, M., & Singh, L. (2005). Prevalence of chromosome defects in azoospermic and oligoasthenoteratozoospermic South Indian infertile men attending an infertility clinic. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(4), 467–472. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60822-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60822-X)
- Rawe, V. Y., Alvarez, C. R., Uriondo, H. W., Papier, S., Miasnik, S., & Nodar, F. (2009). ICSI outcome using Annexin V columns to select non-apoptotic spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 92(3), S73–S74. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.07.284>
- Ray, A., Shah, A., Gudi, A., & Homburg, R. (2012a). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(6), 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.021>
- Ray, A., Shah, A., Gudi, A., & Homburg, R. (2012b). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(6), 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.021>
- Report on varicocele and infertility: a committee opinion. (2014). *Fertility and Sterility*, 102(6), 1556–1560. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.007>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., Navarro, J., & Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), 715–722. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernandez-Encinas, A., Amengual, M. J., Prada, E., Cortés, P., Navarro, J., & Benet, J. (2012). Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. *PLoS ONE*, 7(9), e44679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044679>

- Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., Kirkman-Brown, J., & Coomarasamy, A. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 27(10), 2908–2917. <https://doi.org/10.1093/humrep/des261>
- Rubes, J., Selevan, S. G., Sram, R. J., Evenson, D. P., & Perreault, S. D. (2007). GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 625(1–2), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.05.012>
- Said, T. M., & Land, J. A. (2011). Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17(6), 719–733. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr032>
- Sakkas, D. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*, 4(1), 31–37. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0040031>
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010a). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.046>
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010b). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.046>
- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., & Bizzaro, D. (2002). Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis1. *Biology of Reproduction*, 66(4), 1061–1067. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1061>
- SALLAM, H., BOITRELLE, F., PALINI, S., DURAIRAJANAYAGAM, D., PARMEGIANI, L., JINDAL, S., SALEH, R., COLPI, G., & AGARWAL, A. (2023). ICSI for non-male factor infertility: time to reappraise IVF? *Panminerva Medica*, 65(2). <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.23.04869-3>
- Samplaski, M. K., Dimitromanolakis, A., Lo, K. C., Grober, E. D., Mullen, B., Garbens, A., & Jarvi, K. A. (2015). The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0035-y>
- Santi, D., Spaggiari, G., & Simoni, M. (2018). Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.06.023>
- Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Johnston, S., Mariño, A., Fernández, C., Losada, C., & Fernández, J. L. (2012). DNA fragmentation dynamics allows the assessment of cryptic sperm damage in human: Evaluation of exposure to ionizing radiation, hyperthermia, acidic pH and nitric oxide. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 734(1–2), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.03.006>

- Schaeffer, A. J., & Hotaling, J. M. (2016). Claims-based analysis of male infertility: a cautious step in the right direction. *Fertility and Sterility*, 105(3), 599–600. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.044>
- Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., & Bleau, G. (2005). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction*, 20(12), 3446–3451. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei231>
- Sharma, A., Minhas, S., Dhillon, W. S., & Jayasena, C. N. (2021). Male infertility due to testicular disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 106(2), e442–e459. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa781>
- Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A., & Esteves, S. C. (2016). Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European Urology*, 70(4), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.010>
- Smith, S. (2003). Diagnosis and Management of Female Infertility. *JAMA*, 290(13), 1767. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1767>
- Steures, P., van der Steeg, J. W., Hompes, P. G., Habbema, J. D. F., Eijkemans, M. J., Broekmans, F. J., Verhoeve, H. R., Bossuyt, P. M., van der Veen, F., & Mol, B. W. (2006). Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation versus expectant management for couples with unexplained subfertility and an intermediate prognosis: a randomised clinical trial. *The Lancet*, 368(9531), 216–221. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69042-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69042-9)
- STIRRAT, G. (1990). Recurrent miscarriage II: clinical associations, causes, and management. *The Lancet*, 336(8717), 728–733. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92215-4](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92215-4)
- Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1), 23–37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>
- Sunkara, S. K., Kamath, M. S., Pandian, Z., Gibreel, A., & Bhattacharya, S. (2023). In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2023(9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003357.pub5>
- Takalani, N. B., Monageng, E. M., Mohlala, K., Monsees, T. K., Henkel, R., & Opuwari, C. S. (2023). Role of oxidative stress in male infertility. *Reproduction and Fertility*, 4(3). <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0024>
- Tesarik, J. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 19(3), 611–615. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh127>
- Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M.-L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J.-M., & Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)*. *Human Reproduction*, 6(6), 811–816. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433>

- Twigg, J. P., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1998). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 13(7), 1864–1871. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.7.1864>
- Wang, R., van Eekelen, R., Mochtar, M. H., Mol, F., & van Wely, M. (2020). Treatment Strategies for Unexplained Infertility. *Seminars in Reproductive Medicine*, 38(01), 048–054. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1719074>
- Wordsworth, S., Buchanan, J., Mollison, J., Harrild, K., Robertson, L., Tay, C., Harrold, A., McQueen, D., Lyall, H., Johnston, L., Burrage, J., Grossett, S., Walton, H., Lynch, J., Johnstone, A., Kini, S., Raja, A., Templeton, A., & Bhattacharya, S. (2011). Clomifene citrate and intrauterine insemination as first-line treatments for unexplained infertility: are they cost-effective? *Human Reproduction*, 26(2), 369–375. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq315>
- Xue, X., Wang, W.-S., Shi, J.-Z., Zhang, S.-L., Zhao, W.-Q., Shi, W.-H., Guo, B.-Z., & Qin, Z. (2014). Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(9), 1161–1166. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0287-z>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., & Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520–1524. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>
- Zhang, F., Li, J., Liang, Z., Wu, J., Li, L., Chen, C., Jin, F., & Tian, Y. (2021). Sperm DNA fragmentation and male fertility: a retrospective study of 5114 men attending a reproductive center. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(5), 1133–1141. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02120-5>
- Zini, A., Boman, J. M., Belzile, E., & Ciampi, A. (2008a). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 23(12), 2663–2668. <https://doi.org/10.1093/humrep/den321>
- Zini, A., Boman, J. M., Belzile, E., & Ciampi, A. (2008b). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 23(12), 2663–2668. <https://doi.org/10.1093/humrep/den321>
- Zini, A., Finelli, A., Phang, D., & Jarvi, K. (2000). Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*, 56(6), 1081–1084. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)00770-6](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00770-6)

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek Dr. Máté Gábornak és Dr. Czétány Péternek a munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati segítséget, valamint az OTDK dolgozatom elkészüléséhez nélkülözhetetlen útmutatásukat.

8. Oldatok, vegyszerek

Leukociták meghatározásához oldat: 10 ml 0,9%-os Nátrium-klorid 25 µl 3%-os Peroxid oldat, 50 µl O-Toluidin.

Mosóoldat: Origio Sperm Preparation Medium (Origio REF: 10700060A)

Alsó oldat: 80% SAGE PureCeption 100% Isotonic Solution (Origio REF: ART-2100) + 20% mosóoldat

Felső oldat: 40% SAGE PureCeption 100% Isotonic Solution + 60% mosóoldat

Annexin V reagens: MACS ART Annexin V Reagent (Miltenyi Biotec REF: 200-070-503)

Binding puffer: MACS ART Binding Buffer (Miltenyi Biotec REF: 200-070-505)

Viobility vitalitás jelölő (Miltenyi Biotec REF: 130-130-403)