

---

# A mágneses sejtszeparálás alternatív alkalmazási lehetőségei az asszisztált reprodukció során

---

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Czétány Péter

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

Urológiai Klinika



Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Dr. Kovács Kálmán

Témavezetők: Dr. Szántó Árpád

Dr. Máté Gábor

Pécs, 2024

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

---

ART:	assisted reproductive techniques
BPA:	bisphenol A
BSA:	bovine serum albumin
CASA:	computer assisted sperm analysis
CD:	Cluster of Differentiation
DFI:	DNA-fragmentation index
DGC:	density gradient centrifugation
DTT:	dithiothreitol
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
ESHRE:	European Society of Human Reproduction and Embryology
FITC:	fluorescein isothiocyanate
GPA:	glycophorin A
HBA:	hyaluronan binding assay
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HOST:	hypo-osmotic swelling test
ICSI:	intracytoplasmic sperm injection
IL-6:	interleukin-6
IL-8:	interleukin-8
IMSI:	intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
IUI:	intrauterine insemination
IVF:	in vitro fertilisation
LAISS:	laser-assisted immotile sperm selection
LBR:	live birth rate
MACS:	magnetic activated cell sorting
MALDI:	matrix-assisted laser desorption/ionization
MDA:	malondialdehyd
MSOME:	motile sperm organelle morphology examination
PBS:	phosphate-buffered saline
PICSI:	physiological intracytoplasmic sperm injection
PMN:	polimorphonuclear
PS:	phosphatidyl-serin
RCT:	randomised controlled trial
ROS:	reactive oxygen species
SCD:	sperm chromatin dispersion
SU:	swim up test
TESE:	testicular sperm extraction
TNF- $\alpha$ :	tumor necrosis factor- $\alpha$
TUNEL:	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
WHO:	World Health Organisation
ZEA:	zearalenone

# 1. BEVEZETÉS

---

## 1.1. A meddőség epidemiológiája, etiológiája

A 20. század közepe óta a humán nemzőképesség csökkenése figyelhető meg, mely a Egészségügyi Világszervezet (*World Health Organisation (WHO)*) adatai alapján globálisan hatból egy embert érint (Cox et al., 2022). A *teljes fertilitási ráta* definíció szerint az egy nőre élete során eső élve születések számát jelenti, mortalitás nélkül. A fejlődő országokban jellemző magas születésszámok ellenére ennek világszerte való csökkenése figyelhető meg az emberi faj termékenységét érintő krízis következményeként. A világ népességének kb. 2/3-a él olyan területeken (főként a fejlett országokban), ahol a fertilitási ráta már a kritikus, fenntartási szint (2,1) alá esve lokálisan, hosszútávon a populáció fennmaradását veszélyezteti. Ebben szerepet játszhat a férfiak sperma paramétereinek (volumen, teljes spermiumszám, koncentráció, motilitás, morfológia) világszerte észlelt romlása is (Luo et al., 2023; Pakmanesh et al., 2024; Garcia-Grau et al., 2022; Li et al., 2023), mely szintén a 20. század második felétől kezdődően észlelhető. Levine és mtsai. által egy 2017-ben készített metaanalízis alapján 1973 és 2011 között a spermiumszámban 50-60%-os csökkenés mérhető az Észak-Amerikai, Európai, illetve Ausztráliai férfi populáció körében.

A háttérben álló okok szerteágazóak, közülük mindenképpen megemlítendőek a különböző civilizációs ártalmak: a nyugati típusú életmódból fakadó hatások (ülő életmód, csökkent fizikai aktivitás, következményes elhízás, dohányzás, alkohol fogyasztás, mindkét nemet érintően a későbbi életkorban történő gyermekvállalás, pszichés distressz, stb.) és az iparosodáshoz, illetve a globalizációhoz kapcsolódó környezeti ártalmak (fosszilis energiahordozók és származékaik (pl. műanyagok) kiterjedt alkalmazása, szmog, stb.) (Skakkebaek et al., 2022). Utóbbiakhoz kapcsolódóan fontos kiemelni az ún. *endokrin diszruptorokat*. Ezek olyan kémiai ágensek (peszticidek, műanyagok (pl. biszfenol A (BPA)), fitoösztrogének (pl. szójababban), gombatoxinok (pl. zearalenon (ZEA)), stb.), melyek a szervezetbe jutva, ott ún. *xenoösztrogénként* hatva ösztrogenikus, illetve antiandrogén hatásokat kifejtve felborítják a hormonális szabályozás homeosztázisát, továbbá oxidatív stresszorként is hathatnak, mindezek által mindkét nemből rontják a termékenységet (Czarnywojtek et al., 2021).

*Meddőségről* definíció szerint fogamzásgátlás nélkül, rendszeres házas élet mellett legalább egy éve spontán terhességet el nem érő párok esetében beszélünk. Ezen párok számára 1978, az első „lombikbébi” születésének éve (Kamel et al., 2013) óta az *asszisztált reprodukciós technikák (ART)* kínálnak lehetőséget ahhoz, hogy saját biológiai utódjuk legyen. Évtizedek óta

tartó fejlődésük és a világszerte történő alkalmazásuk ellenére hatékonyságuk relatíve alacsonynak mondható: 2021-ben az USA-ban csak a ciklusok 37,3%-a eredményezett élve születést. Esetükben kb. 30-50%-ban találjuk férfi eredetű faktor jelenlétét (Winters and Walsh, 2014), melynek vizsgálata és kezelése az andrológia tárgykörébe esik.

## 1.2. Spermium szelekció

Az asszisztált reprodukció, különösen az intracitoplazmatikus spermium injekció (ICSI) során a női genitális traktusban a spermiumokra ható természetes szelekciós hatások kikapcsolásra kerülnek. Ilyen szelekciós mechanizmust jelent a hüvelyi savas pH, a cervikális nyák konzisztenciájának megváltozása, a sejtes immunválasz, a spermium-epitélium interakció a tuba uterina isthmusában, illetve a spermium-zona pellucida interakció (Suarez and Pacey, 2006; Sánchez-Calabuig et al., 2014) is. Ezek következtében a legnagyobb fertilizációs potenciállal rendelkező spermium szubpopuláció választódik ki. Teoretikusan ezen spermiumok mesterséges szelekciójával, majd további felhasználásával az ART eredményessége javítható. Ennek céljából több spermium szelekciós technika került kifejlesztésre, azonban mindeközéig egyik sem bizonyult hatékonyabbnak a többinél a klinikai eredmények (főként az élve születési ráta (*live birth rate, LBR*)) vonatkozásában (Vaughan and Sakkas, 2019; Baldini et al., 2021).

A *konvencionális* spermium elválasztási technikák közé tartozik a felúszási teszt (*swim-up, SU*) és a sűrűség gradiens centrifugálás (*density gradient centrifugation, DGC*), melyek egyszerűen elvégezhetők, különösebb speciális tudást, eszközt nem igényelnek, így manapság a meddőségi centrumokban általánosan alkalmazott módszerek az ondóminta előkészítése során. Speciális esetekben (igen alacsony sejtszám (súlyos oligozoospermia, cryptozoospermia), magas viszkozitás) ezen konvencionális spermium szelekciós módszerek sajnos nem hatékonyak, ilyenkor alkalmazhatók az ún. *fejlett* spermium szelekciós eljárások.

A fejlett technikák a következők: zéta potenciál alapú szelekció, motilis spermiumok organellumainak morfológiai vizsgálata (*motile sperm organelle morphology examination (MSOME)*)→ *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI)*), hialuronsav kötődési vizsgálat (*hyaluronan binding assay (HBA)*)→ *physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI)*), mágneses sejt szeparálás (*magnetic activated cell sorting (MACS)*), mikrofluidikai eljárások, hipo-ozmotikus duzzadási teszt (*hypo-osmotic swelling test (HOST)*), lézer-asszisztált immotilis spermium szelekció (*laser-assisted selection of immotile sperm (LAISS)*), polarizációs mikroszkópia alapú szelekció, stb (Pinto et al., 2021). A felsorolt összes

módszer működésének részletezése meghaladja jelen írás kereteit, így tekintettel az értekezés témájára, a MACS technika alapjait részletezzük.

### 1.2.1. Mágneses sejt szeparálás (MACS)

A mágneses sejtszeparálás során különféle szeparációs stratégiák léteznek, a legelterjedtebb technikák bizonyos sejtfelszíni markerek alapján szelektálnak, mely markereket speciális ligandokkal konjugálják. Ezek a ligandok leggyakrabban antitestek, de szintetikus molekulák (pl. peptidek, aptamerek) is alkalmazhatók. A MACS előnye az egyszerű alkalmazhatósága (különösebb szakértelmet, képzett kezelőt nem igényel), a mágneses tér erősségének precíz állíthatósága, specifikusan az adott célsejthez való optimalizálhatósága, összetett szeparációs rendszerekbe való integrálhatósága, illetve magas szelektivitása. A módszer használata során a fő problémát célsejtek mikrogyöngyökről való, életképességük/funkciójuk károsítása nélküli leválasztása jelenti. Ez elérhető számtalan különböző módon (telített fehérje oldat, enzimek, hőmérséklet/pH/elektromos töltöttség/fényváltozás indukálta, aptamerek, hidrogél, stb.) (Plouffe et al., 2015), a legkézenfekvőbbnek az összes, nem kívánt sejt kiszelektálása adódna, így a szeparáló oszlop alján kizárólag a célsejtek gyűlnének össze (ún. *negatív szelekció*), azonban biológiai minták esetében tekintettel a sokféle szennyező sejtre ez a megközelítés komoly kihívást jelenthet.

A reprodukív medicinában elsőként 2001-ben Grunewald és mtsai. alkalmazták a módszert apoptotikus spermiumok eliminálására krioprezervált, majd felolvasztott ondó mintákból. Az apoptózis folyamata során az érintett sejtekben molekuláris változások sora megy végbe a sejtmembránban, illetve intracellularisan, Az egyik fontos momentum a normális esetben a sejtmembrán belső felszínén elhelyezkedő foszfolipid molekula, a foszfatidil-serin (*phosphatidyl-serin, PS*) externalizációja (Fadok et al., 1992). Sajnálatos módon, korai apoptotikus jeleket hordozó spermium képes jelentős motilitást érintő károsodás, illetve morfológiai eltérés nélkül funkcionálni, így a programozott sejthalál későbbi fázisait elkerülve megtermékenyíteni a petesejtet (Garrido and Gil Juliá, 2024). Egy Hichri és mtsai. által 2018-ban közzétett tanulmányban a spermium különféle apoptotikus változásai (aktivált kaszpázok aránya, externalizált PS, fragmentált DNS) az ART-k kimenetelének független prediktorának bizonyultak a klasszikus paraméterektől függetlenül. Közülük a DNS-fragmentáció mutatta a legjobb prediktív értéket. Az eredeti módszer a PS annexin V nevű fehérjéhez való nagy affinitású kötődésén alapul. Az annexin V molekulákat mágneses mikrogyöngyök felszínéhez konjugáljuk, majd ezekkel a mikrogyöngyökkel megfelelő ideig inkubáljuk, jelöljük a

spermium sejteket. Ezt követően a mintát mágneses térbe helyezett szeparáló oszlopra töltjük. Az apoptotikus spermiumok kikötnek az annexin V-höz, és az oszlopon visszamaradnak (*pozitív frakció*). Az egészséges spermiumok az oszlopon kötődés nélkül átjutnak, ezáltal szeparálva kinyerhetők (*negatív frakció*) (Said et al., 2006).

Korábban számos tanulmányban igazolták már, hogy a MACS hatékonyan csökkenti a DNS-fragmentációt és a strukturális kromoszómális eltérések előfordulását a kezelt ondó mintában, általa a magasabb DNS-integritással rendelkező, így az asszisztált reprodukciós módszerek számára magasabb minőségű spermiumok izolálhatóak (Said et al., 2006; Aziz et al., 2007; de Vantéry Arrighi et al., 2009; Lee et al., 2010; Zahedi et al., 2013; Bucar et al., 2015; Degheidy et al., 2015; Chi et al., 2016; Martínez et al., 2018; El Fekih et al., 2020). Mindezek ellenére, a technika ART-k kimenetelére gyakorolt valós, pozitív klinikai hatása egyelőre nagy esetszámú randomizált-kontrollált tanulmányokban (RCT) nem került bizonyításra, így a jelenlegi európai asszisztált reprodukciós irányelvek (*European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)*) alkalmazását egyelőre nem ajánlják (Lundin et al., 2023). Habár a módszer alkalmazását támogatandó, magas szintű evidencia, illetve szakmai ajánlás nem áll rendelkezésre, meddőségi centrumokban gyakran ajánlják olyan pároknak, akiknél két alkalommal sikertelen ICSI vagy ismeretlen eredetű vetélés történt magas spermium DNS-fragmentáció mellett, ennek minden esetben egyéni mérlegelést követően, részletes tájékoztatás, illetve konzultáció megtörténtét követően kell történnie (Garrido and Gil Juliá, 2024).

### 1.3. Abszolút asthenozoospermia

Fiziológiásan a spermiumok érése a mellékhere csatornáiban történő tranzitjuk során zajlik. melynek eredményeként a spermium alkalmassá válik a későbbi kapacitáció lezajlására, illetve szert tesz progresszív motilitási képességére (Gervasi and Visconti, 2017). Ez utóbbinak főként a vaginától a tubáig való eljutásban és a cumulus oophorus-on való penetrációban van jelentősége, ezáltal egyértelmű kapcsolat áll fenn a spermium motilitása és fertilizációs képessége között (Beauchamp et al., 1984).

Az abszolút asthenozoospermia egy ritka rendellenesség (előfordulás: 1/5000 férfi) a motilitás teljes hiányát jelenti a friss ejakulátumban. Hátterében intrinszik (flagellum ultrastrukturális defektusai-pl. Kartagener-szindróma, mitokondriális rendellenességek) és extrinszik (necrozoospermia infekciók, oxidatív stressz, spermium ellenes antitestek, szennyező anyagok általi környezeti expozíció (pl. peszticidek), krioprezerváció, hosszú

önmeztartóztatás következtében) okok is felmerülnek, de számos esetben idiopátiás jelenségről beszélünk (Ortega et al., 2011; Chen et al., 2022). Természetesen a tesztikuláris spermiumok immotilitása fiziológiás jelenség, mely a metabolikus éretlenségük és a Sertoli-sejtekkel való esetlegesen még meglévő kapcsolataik következménye.

Nagy és mtsai. már 1995-ben 966 esetet retrospektíven vizsgálva kimutatták, hogy az ICSI esetében a módszer által még a klasszikus paraméterek szempontjából súlyosan kompromittált spermaképet mutató betegek (pl. cryptozoospermia, súlyos astheno-/teratozoospermia) esetében is magas fertilizációs és terhességi ráták érhetők el. Férfi oldalról egyetlen tényező bizonyult erős negatív prediktív értékűnek: az immotilis (feltehetően non-viabilis) spermium felhasználásával történő megtermékenyítés.

Míg spermiumok *vitalitása* az intakt sejtmembránjuk alapján indirekten mért élő spermium arányt jelenti, addig a *viabilitás* egy jóval szofisztikáltabb, a funkcionális integritást figyelembe vevő fogalom (Hecht and Jeyendran, 2022), azonban ezeket a kifejezéseket a laboratóriumi gyakorlatban sokszor felcserélhetőnek véelve, azonos jelentéssel alkalmazzák.

Az immotilis spermiumok vitalitása az egyszerű eosin-nigrosin festéssel egyszerűen megítélhető, ezáltal a 100% immotilis, élő spermiumokat tartalmazó minta a necrozoospermiás mintától differenciálható, azonban az így vizualizált életképes spermiumok asszisztált reprodukcióhoz már nem felhasználhatók. A spermiumok felhasználhatóságának megőrzése melletti viabilitás meghatározásra több módszert is említ az irodalom (pl. spermium farki rész elaszticitásának vizsgálata, HOST, dióda lézer impulzus leadása a spermium farki részére (LAISS), foszfodiészteráz gátlók (pentoxifillin, teofillin, 2-deoxyadenozin) alkalmazása, kettős fénytörés vizsgálata (Yovich et al., 1988; Liu et al., 1997; Soares et al., 2003; Aktan et al., 2004; Baccetti, 2004; Ortega et al., 2011; Ebner et al., 2014)), azonban ezek felhasználása problematikus lehet pontatlanságuk, invazívitásuk, potenciális toxicitásuk miatt.

## 1.4. Leukocitospermia jelentősége

Az reprodukciós technikákhoz való felhasználásra ideális ondóminta nem tartalmaz szennyező sejteket (fehérvérsejt, vörösvértest, hámsejt, stb.). Ezzel szemben, a férfi genitális traktusban, illetve az ondóutakban fehérvérsejtek fiziológiásan is jelen vannak, ott fontos szerepet játszanak különböző, a homeosztázis fenntartásához hozzájáruló folyamatokban (pl. abnormális/elöregedő spermiumok fagocitózisa a mellékherében jelenlévő makrofágok által, patogének eliminációja („*immunosurveillance*”)) (Khodamoradi et al., 2020; Henkel, 2024). A mindennapi klinikai gyakorlatot tekintve, szinte minden vizsgált minta valamilyen mértékben

szennyezett fehérvérsejtekkel (főként polimorfonukleáris (PMN) sejtekkel (granulocitákkal, 50-60%) (Wolff, 1995)). A WHO aktuális iránymutatása alapján (*WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed., 2021*) csak a  $1,0 \times 10^6/\text{ml}$  koncentrációt meghaladó mértékű jelenlétük bír klinikai jelentőséggel és tartható abnormálisnak. A leukocitospermia prevalenciája a meddő férfiak esetében nagyjából 10-20%-ra tehető (Wolff, 1995).

Az irodalmat áttekintve, a leukocitospermia és a csökkent sperma paraméterek, következésképpen a férfi szub-, illetve infertilitás közti potenciális relációt alátámasztó számos adat lelhető fel. Fehérvérsejtek általi infiltráció leggyakrabban az ondóutak fertőzéseinek (orchitis, epididymitis, prostatitis) következménye, azonban egyéb non-infektív, citokin szinteket emelő állapotok, hatások (pl. varicocele, dohányzás, marihuána-, alkoholfogyasztás) (Close et al., 1990; Mongioi et al., 2020) következtében is kialakulhat. A PMN sejteket gyulladáshoz citokinek aktiválják, melyet ROS-produkció („oxidative burst”), következményes oxidatív stressz követ (Saleh et al., 2002). Amennyiben az oxidatív hatások túlsúlyba kerülnek és a szeminalis plazma antioxidáns enzimrendszerének kapacitását meghaladják, lipid peroxidáció, a membrán integritás elvesztése, ezek következményeként mitokondriális, illetve nukleáris DNS sérülése, fragmentációja alakulhat ki (Derbel et al., 2021), mely végül akár a spermium apoptózisához is vezethet. Mindezek a változások klinikailag a klasszikus paraméterek (térfogat, koncentráció, progresszív/teljes motilitás) romlása, illetve gátolt spermium-oocita fúzió képében jelennek meg (Aitken et al., 1994; Plante et al., 1994; Fraczek et al., 2016; Fan et al., 2023).

## 1.5. Hemospermia és a hereszövet mintákat szennyező vörösvértetek jelentősége

A hemospermia a vér ondóban való megjelenését jelenti, mely számos patológias folyamat következményeként (ondóúti fertőzések, urogenitális malignitások (prostatata-, hólyag-, heretumor), prosztatikus/ondóhólyag ciszták, stb.) megjelenhet, habár az esetek kb. 30-70%-ban a folyamat idiopátiásnak mondható (Mathers et al., 2017). A sebészi spermiumnyerés egyik gyakran alkalmazott műtéti eljárása, az ún. *tesztikuláris spermium extrakció (TESE)* során nyert hereszövet minta nem csupán spermatozoát, hanem spermium előalakokat, más eredetű sejteket (fehérvérsejtek, vörösvértetek, epitel sejtek) is tartalmaz.

Az említett esetekben az asszisztált reprodukcióhoz felhasználni kívánt biológiai mintában található vörösvértetek potenciálisan negatív hatásokat fejthetnek ki a spermiumokra. Azon



minták esetében, melyekben csak néhány spermium lelhető fel, a többségben lévő számos vörösvértest extrémén megnehezítheti és időigényessé teheti ezek izolálását, különösen, ha tesztikuláris minta esetében ezek immotilisak is. Ezt kiküszöbölendő, több módszer került kifejlesztésre eddig (eritrocita-lízis puffer oldat, pentoxifillin alkalmazása a motilitás stimulálására), de ezek biztonságos felhasználhatósága továbbra is kérdéses (Tournaye et al., 1994; Popal and Nagy, 2013; Soygur et al., 2018; Yazdinejad et al., 2020). A spermiumok krioprezervációja későbbi felhasználásra (pl. heretumoros betegeknél szervvesztő műtét, onkoterápia megkezdése előtt) mára mindennapi gyakorlattá vált a meddőségi centrumokban, ezzel kapcsolatban fontos aspektus a vörösvértestek hemolízise okozta potenciálisan káros – a felszabaduló hem és vas molekulák által kifejtett kombinált oxidatív és direkt citotoxikus - hatás a felolvasztott spermiumokra (Rijsselaere et al., 2004).

## 1.6. Cluster of differentiation

A *Cluster of differentiation* (CD) nevű molekuláris azonosítási rendszer alapjait 1982-ben Párizsban fektették le (Bernard and Boumsell, 1984): hasonló sejtfelszíni antigének ún. *klaszterein* alapul, melyeket ugyanazon antitest ismer fel, így megadva a lehetőségét a különböző sejtpopulációk immunfenotípus alapján való elkülönítésének. Jelenleg több, mint 400 különböző fehérje került besorolásra CD markerként (Tian et al., 2022).

### 1.6.1. CD45

A CD45 markert *közös leukocita antigénnek* is nevezzük, mivel genetikailag magasan konzervált szerkezetű membrán glikoproteinként - az érett vörösvértesteket és vérlemezkéket leszámítva - minden érett magvas hemopoetikus sejt felszínén megtalálható, kulcsszerepet játszva az immunválasz szabályozásában (Rheinländer et al., 2018).

### 1.6.2. CD235a

A CD235a egy *glycophorin A (GPA)* nevű transzmembrán glikoproteint jelöl, mely vörösvértesteken és azok előalakjain van jelen, strukturális, a vörösvértestek alakjának kialakításában játszott élettani szerepe ismert (Karsten et al., 2010). Ezentúl patológias folyamatokban is szerepet játszik különböző kórokozók, például a maláriát okozó protozoon, a *Plasmodium falciparum* receptoraként viselkedve (Ridgwell et al., 1983).

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

---

Az eredeti, annexin V-alapú szeparálási módszeren túl a technika több lehetőséget is rejthet: az alkalmazott mikrogyöngyök felszínéhez tetszőleges célmolekulát célzó antitest köthető (akár egyszerre többféle is), így az őket jellemző sejtfelszíni markerek alapján akár a magas integritású örökítőanyaggal bíró, magas fertilizációs potenciállal rendelkező spermiumok szuperszelekciója, akár az alkalmazott biológiai mintát szennyező, annak feldolgozhatóságát nehezítő sejtek (pl. fehérvérsejtek, vörösvértestek az ondó, illetve a sebészi spermiumnyerés során nyert hereszövet mintában) kiszűrése lehetővé válhatna.

Doktori munkám első felében az eredeti módszer egy speciális alkalmazhatóságát vizsgáltam, a második felében pedig a szennyező sejtek kiszűrésének lehetőségeivel foglalkoztam. A következő kérdéseket vizsgáltuk meg:

1. Csökkenthető-e szignifikánsan az emelkedett DNS-fragmentációt mutató ondóminták DNS-fragmentációs indexe (DFI) annexin V alapú MACS segítségével? (Ezt a pozitív effektust korábban számos tanulmányban leírták, ezt ellenőriztük.)
2. A spermiumok vitalitása és DFI értéke közötti korreláció vizsgálata. DFI csökkenés megnyilvánul-e emelkedett vitalításban, ezáltal javítható-e jelentősen a vitalitás abszolút asthenozoospermia esetén annexin V alapú MACS által? (A rendellenesség ritka előfordulása okán egy esettanulmány kapcsán, retrospektív vizsgálva.)
3. Csökkenthető-e szignifikánsan a leukocitospermiás ondómintákban a szennyező fehérvérsejtek aránya CD45 molekulát célzó mágneses szeparálás által?
4. Csökkenthető-e szignifikánsan TESE során nyert hereszövet mintákban a szennyező vörösvértestek aránya CD235a molekulát célzó mágneses szeparálás által?

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

---

### 3.1. Mintagyűjtés, alapvizsgálatok

Az ondóminták gyűjtésére 3 nap önmegtartóztatást követően maszturbáció útján került sor. 37°C-on inkubálva, az elfolyósodást követően legkésőbb 1 órán belül végeztük el a minták vizsgálatát CASA rendszer (SCA SCOPE, gyártó: Microptic S.L., Barcelona, Spanyolország), illetve áramlási citométer (MACSQuant Analyzer 16, gyártó: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) segítségével. Mindennapi klinikai gyakorlatunkban minden andrológiai vizsgálatra jelentkező férfi beteg a leadott ondó minta klasszikus paraméterek (spermium szám, koncentráció, motilitás, progresszív motilitás, morfológia, vitalitás, kerek és peroxidáz-pozitív sejtek száma) szerinti sperma analízisen, illetve DNS-fragmentáció mérésén esik át.

17 beteg rutin vizsgálata során észlelt magas DFI-ű (>30%) ondó mintája esetében tudományos céllal annexin V jelölést és mágneses szeparációt végeztünk.

13 betegnél rutin vizsgálatuk során leukocitospermiát észleltünk, esetükben tudományos céllal szintén mágneses szeparálást végeztünk.

12 beteg esetében meddőségi kezelés részeként TESE történt, az esetükben a hereszövet minta mechanikus feldolgozását követően sűrűség gradiens centrifugálást végeztünk a nagyobb szövetfragmentumok eltávolítása céljából. Az így feldolgozott minta centrifugálását követően a szedimentumot használtuk fel a további mágneses szeparáció során. Ezen betegek esetében beválogatási kritérium volt a műtét pozitív kimenetele, a megerősített spermium találat.

További 205 beteg rutin vizsgálata kapcsán adataikon retrospektív módon korrelációkat állítottunk fel a vitalitás és a DNS-fragmentáció között. Egy esetben abszolút astenozoospermiát mutató spermaképző beteg került felismerésre, esetében tudományos céllal annexin V jelölést és mágneses szeparációt végeztünk.

A mintaadás minden fenti esetben önkéntes alapon, írásos beleegyezést követően történt a Dunamenti Reprodukciós Központ Pannon Telephelyén (korábban Pannon Reprodukciós Intézet, Tapolca), illetve PTE KK Urológiai Klinikán (Pécs). Vizsgálatainkat a PTE KK Regionális Kutatás-Értékelési Bizottság előzetes engedélyével végeztük.

### 3.2. Apoptotikus spermiumok mágneses szeparációja

A spermiumszám meghatározását követően, az elfolyósodott ondó minta sűrűség gradiens centrifugálását végeztük ( $300\times g$ , 12 min). Ehhez 40%, illetve 80% PureCeption™ (gyártó: Cooper Surgical Inc., Trumbull, Connecticut, USA) oldatokat használtunk, ez kovalensen kötött hidrofil szilán molekulák által stabilizált szilikát részecskék steril kolloid szuszpenziója, HEPES oldattal pufferelt humán tubáris folyadékkal formulázva. Az eljárás során 1 ml 80%-os oldatot töltöttünk az edény aljára, majd további 1 ml 40%-os oldatot rétegeztünk lassan ennek tetejére. A PureCeption™ oldatot spermium előkészítő médiummal hígítottuk. Ezt követően megfelelő mennyiségű elfolyósodott ondót rétegeztünk óvatosan a felső fázis (40%) tetejére. Az így előkészített kémcsövet a fentiek szerint centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, majd a pelletet MACS ART binding buffer oldatban reszuszpendáltuk úgy, hogy a koncentráció  $1-2\times 10^7$  spermium/ml legyen és ismételten centrifugáltuk ( $300\times g$ , 4 min). A felülúszót ismét eltávolítottuk, 200  $\mu$ l MACS ART annexin V reagenst, majd 500  $\mu$ l teljes térfogatig MACS ART binding buffer oldatot adtunk a sejtekhez. Az oldatot 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A MACS ART MS szeparációs oszlopot MACS ART binding buffer oldattal átmostuk, majd az előkészített, jelölt mintát az oszlopra töltöttük. Az oszlopon átjutó, jelöletlen sejteket felfogtuk. A szeparációs eljárás megelőzően, illetve utána DNS-fragmentáció mérést végeztünk TUNEL assay alkalmazásával, a Sharma és mtsai. által leírt módszer (Sharma et al., 2016) szerint. A DFI-et a TUNEL-pozitív sejtek számát a teljes sejt számmal elosztva számoltuk ki.

Az abszolút asthenozoospermiás minta esetében a vitalitás meghatározását eosin festéssel végeztük, a DNS-fragmentáció vizsgálata SCD módszer (Fernández et al., 2003) szerint történt a gyártó utasításai és a WHO ajánlásai szerint, egyebekben a mintagyűjtés és alapvizsgálatok a fentiekben részletezetteknek megfelelően zajlottak. A vitalitás meghatározásához 5  $\mu$ l ondómintához ugyanennyi 1% eosin-Y oldatot kevertünk, tárgylemezen kenetet húztunk belőle, fedőlemezzel fedtük, 30 sec-ig  $37^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk, majd 200 spermatozoon-t értékeltünk. Az SCD teszt során az ondómintát PBS-sel hígítottuk 5-10 millió/ml koncentrációig, 30  $\mu$ l mintát 1% agarózzal kevertünk össze  $37^{\circ}\text{C}$ -on, majd ebből 14  $\mu$ l-t egy előkészített, agarózzal borított tárgylemezre pipettáztunk, fedőlemezzel fedtük. Ezt 5 percig  $4^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk, majd a fedőlemezt eltávolítva a tárgylemezt 7 percig denaturációs oldatba (0.08 M HCl), majd 25 percig lízis pufferbe (0,4 M Tris, 0,4 M DTT, 50 mM EDTA, 0,3% SDS and 1% Triton Xysis) merítettük szobahőmérsékleten. Végül desztillált vízzel alaposan leöblítettük, majd felszálló alkohol sorral (70, 90, illetve 100% etanol, mindegyik 2 percig) dehidráltuk, levegőn megszáritottuk, Giemsa-festést követően SCA Scope segítségével vizsgáltuk. Ennek során a

spermiumok feje körüli ún. „halo” került megfigyelésre, mely a normál, egészséges sejtek esetében megtartott, míg fragmentált DNS-sel bírók esetében minimális vagy teljesen el is tűnik (a jelenség a denaturált, így deproteinált nukleoidban lévő ép DNS hurkok fénydiszperzióján alapul). A vizsgálat során minimum 200 spermatozoon került értékelésre. Az annexin V alapú MACS szeparáció a fentiekkel identikusan történt, a vitalitás és a DFI meghatározása a szeparáció előtt és után is elvégzésre került. A DFI-et a fragmentált DNS-ű sejtek számát a teljes sejtszámmal elosztva számoltuk ki. DFI határérték tekintetében az SCD teszt esetében általánosan elfogadott 30%-ot alkalmaztuk.

### 3.3. Fehérvérsejtek mágneses szeparációja

Az ondómintákat lecentrifugáltuk ( $300\times g$ , 10 min), a szeminális plazmát leszívtuk, majd a pelletet  $80\ \mu\text{l}/10^7$  sejt puffer oldatban reszuszpendáltuk (PBS, mely 0.5% BSA-t és 2 mM EDTA-t tartalmazott, pH 7.2). Ezt követően  $20\ \mu\text{l}/10^7$  sejt CD45 (clone REA747) mágneses mikrogyöngyöt adtunk a mintához. Az így kapott oldat összekeverését követően azt 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk (a gyártó  $4-8^\circ\text{C}$ -ot javasolt, azonban ez a spermiumok esetében közel sem lenne ideális). Inkubációt követően további 2 ml PBS-t adtunk a mintához, majd a fentieknek megfelelően ismételt centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, majd  $10^8$  számú sejtet  $500\ \mu\text{l}$  PBS-ben is ismételt reszuszpendáltunk. Az LS szeparációs oszlopot PBS-sel átmostuk, majd a jelölt sejtsuszpenziót az oszlopra töltöttük. Az oszlopon átjutó, jelöletlen sejteket felfogtuk. Ez utóbbi sejtfrakciót CD45-FITC festékkel jelöltük, hogy a CD45+ sejtek eliminációját igazoljuk, ehhez áramlási citometriát alkalmaztunk. A CD45+ sejtek aránya a mágneses szeparációt megelőzően, illetve azt követően is meghatározásra került.

### 3.4. Vörösvértetek mágneses szeparációja

Az korábban leírt módszer szerint előkészített hereszövet mintákat centrifugáltuk ( $300\times g$ , 10 min), a felülúszót leszívtuk és a pelletet  $80\ \mu\text{l}/10^7$  sejt PBS oldatban reszuszpendáltuk, majd  $20\ \mu\text{l}/10^7$  sejt CD235a (clone REA175) mágneses mikrogyöngyöt adtunk hozzá. Az oldatot összekevertük, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően 2 ml PBS-t adtunk a mintához, majd a fentiek szerint lecentrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, majd  $10^8$  számú sejtet  $500\ \mu\text{l}$  PBS-ben is ismételt reszuszpendáltunk. Az LS szeparációs oszlopot PBS-sel átmostuk, majd a jelölt sejtsuszpenziót az oszlopra töltöttük. Az oszlopon átjutó, jelöletlen sejteket felfogtuk. A mintában lévő vörösvértetek száma a mágneses szeparációt megelőzően, illetve

azt követően is meghatározásra került fény mikroszkóp segítségével. A vörösvértesteket morfológiai jellemzőik (szín, alak) alapján azonosítottuk.

### 3.5. Vegyszerek

A mágneseses szeparáláshoz alkalmazott annexin V, CD45 és CD235a mikrogyöngyöket, illetve a fluoreszcens jelöléshez használt CD45-FITC fluorofórt a Miltenyi Biotec-től vásároltuk. A minták előkészítéséhez használt puffer oldatok a Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) által gyártott termékek voltak. A DNS-fragmentáció vizsgálatához alkalmazott TUNEL assay-t a Thermo Fisher Scientific-től (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), míg az SCD teszthez használt reagenseket kitént a Microptic S.L.-től vásároltuk. A sűrűség gradiens centrifugáláshoz használt PureCeption™ és spermium tápoldatokat az Origio gyártotta (CooperSurgical, Trumbull, Connecticut, USA).

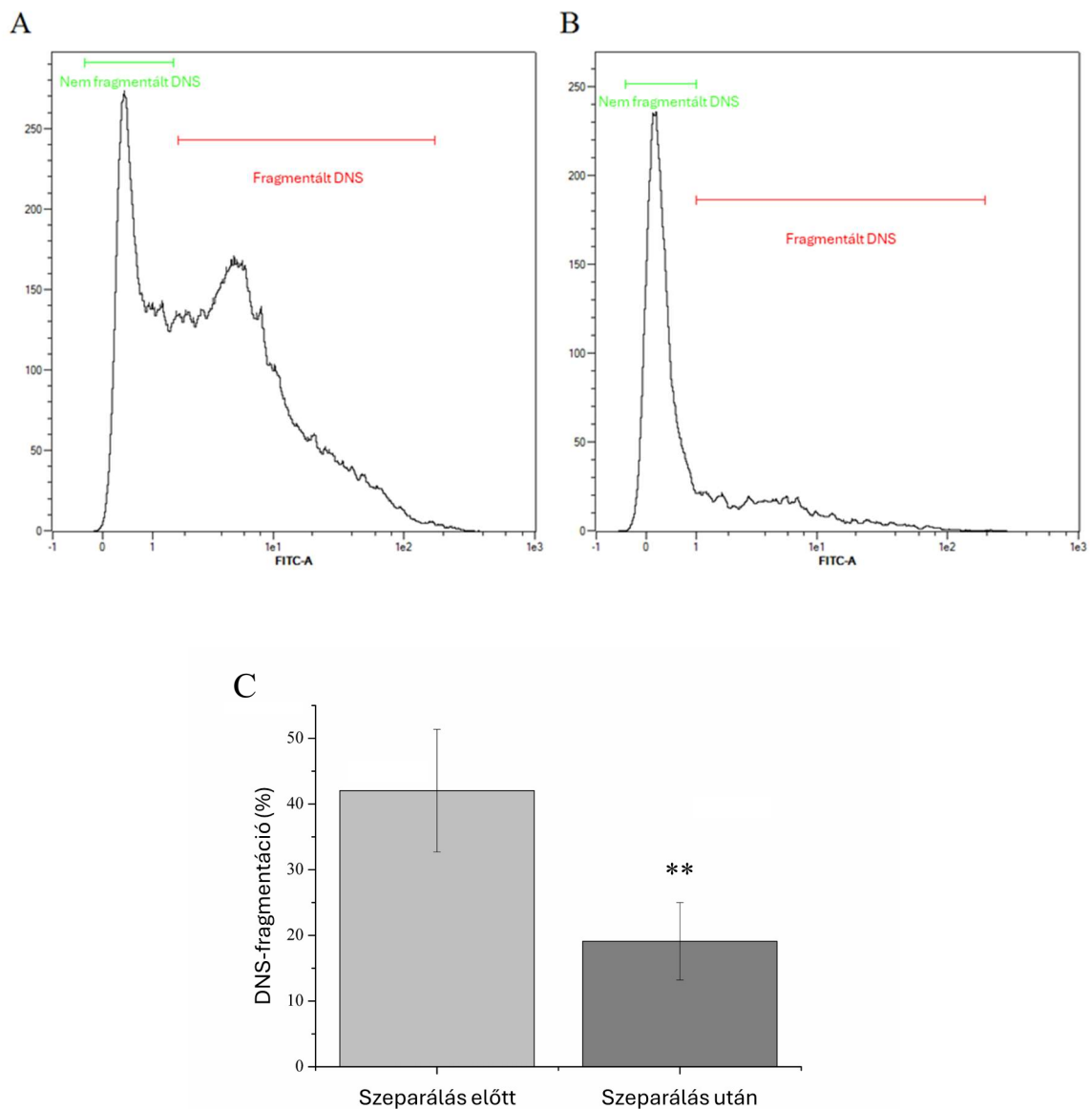
### 3.6. Statisztikai analízis

Az adatokat azok átlagával és a szórással, illetve a boxplot diagramok esetében ezek mellett a medián és az alsó, illetve felső kvartilis értékkel jelenítettük meg. Az adatok eloszlásának vizsgálatára Shapiro-Wilks tesztet alkalmaztuk. Az így meghatározott normál eloszlású változókat parametrikus teszttel, kétmintás t-próbával, a nem normál eloszlást mutató változókat Kruskal-Wallis non-parametrikus teszttel vizsgáltuk. A GraphPad in Stat 7.0 szoftvert (Dotmatics, Graphpad Software Inc., Boston, Massachusetts, USA) használtuk a fentiek elvégzéséhez.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Magas DNS-fragmentációjú spermiumok mágneses szeparálása

Mivel a beválogatási kritérium a magas DFI volt, szeparáció előtt a spermiumok átlagos DFI értéke  $42,04 \pm 9,34\%$  volt. Szeparációt követően  $2,19\times$  csökkenés volt megfigyelhető,  $19,11 \pm 5,90\%$ -ra ( $p < 0,01$ ; 1. ábra).



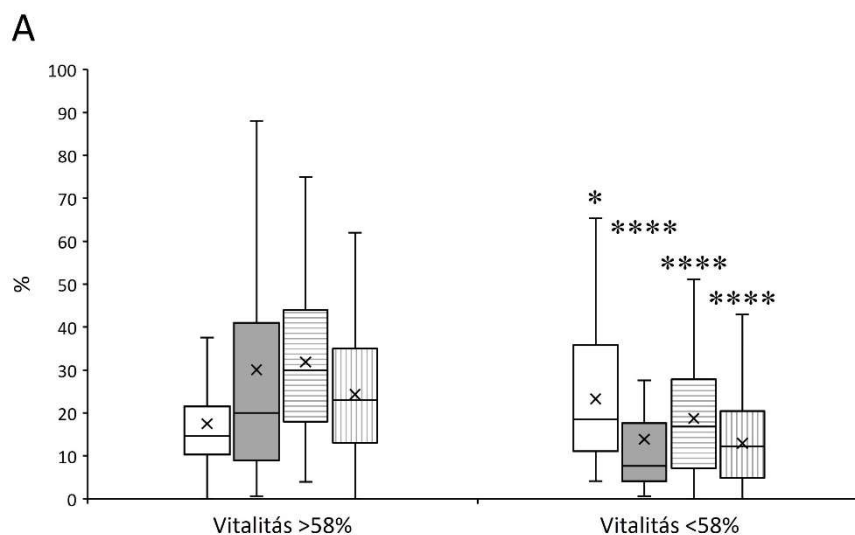
1. ábra: Az annexin V jelölés alapú mágneses szeparálás hatása a spermiumok DNS-fragmentációjára. DNS-fragmentáció a TUNEL assay-vel végzett mérés alapján a szeparálás előtt (A) és után (B). DFI szeparálás előtt és után (C). \*\* $p < 0,01$ ; kétmintás t-próba.

## 4.2. A vitalitás, DNS-fragmentáció és klasszikus sperma paraméterek közötti lehetséges összefüggések vizsgálata

A retrospektíven vizsgált 205 minta közül 170 alacsony DFI-t (<30%) mutatott, míg 35 a magas DFI-ű (>30%) csoportba esett. 151 esetben normál vitalitást (>58%) észleltünk, míg 54 esetben necrozoospermia volt látható.

A DFI 1,36× magasabb volt a necrozoospermiát (vitalitás: <58%) mutató csoport esetében a normál vitalitású mintákhoz (vitalitás: >58%) viszonyítva ( $17,38 \pm 10,38\%$  vs.  $23,71 \pm 16,17\%$ ;  $p=0,0261$ ). A koncentráció, a motilitás, illetve a progresszív motilitás a következőképpen alakultak a két csoportban:  $30,07 \pm 29,50$  M/ml vs.  $13,58 \pm 16,81$  M/ml,  $31,86 \pm 16,65\%$  vs.  $18,31 \pm 11,94\%$ , illetve  $24,31 \pm 14,11$  vs.  $12,67 \pm 9,95\%$  (2/A. ábra).

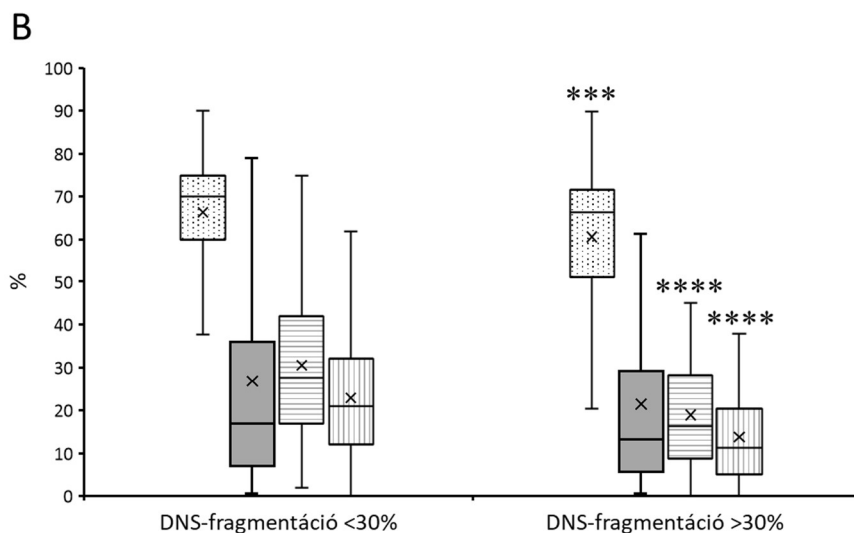
A DFI irányából megközelítve még jelentősebb különbségek látszottak ( $p<0,001$ ): az alacsony DFI-t mutató csoportban a vitalitás  $66,91 \pm 14,08\%$  volt, míg ez a magas DFI-ű csoportban  $56,25 \pm 16,44\%$ -nak adódott. A koncentráció, a motilitás, illetve a progresszív motilitás a következőképpen alakultak a két csoportban:  $26,52 \pm 28,51$  M/ml vs.  $21,85 \pm 23,22$  M/ml,  $30,51 \pm 16,67\%$  vs.  $17,51 \pm 11,53\%$ , illetve  $23,01 \pm 14,23\%$  vs.  $12,68 \pm 9,68\%$  (2/B. ábra).



2/A. ábra: A spermiumok vitalitásának és a DNS-fragmentáció korrelációja. (A) DNS-fragmentáció (fehér oszlop), spermium koncentráció (szürke oszlop), motilitás (vívzszintesen vonalazott oszlop), progresszív motilitás (függőlegesen vonalazott oszlop) normális vitalitás vs. necrozoospermia esetén.

\* $p<0,05$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ ; Kruskal-Wallis teszt.





2/B. ábra: A spermiumok vitalitásának és a DNS-fragmentáció korrelációja.

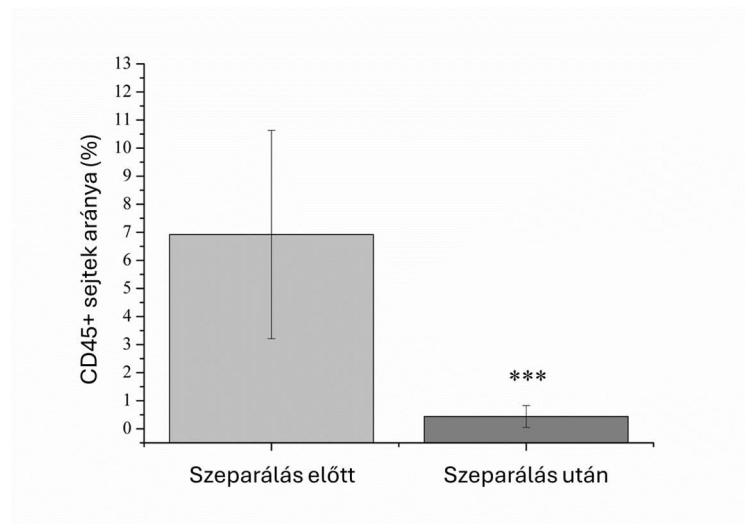
(B) Vitalitás (pontozott oszlop), spermium koncentráció (szürke oszlop), motilitás (vízszintesen vonalazott oszlop), progresszív motilitás (függőlegesen vonalazott oszlop) alacsony vs. magas DNS-fragmentáció esetén. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Kruskal-Wallis teszt.

### 4.3. Abszolút asthenozoospermiás minta mágneses szeparációja

Esettanulmányunkban a vizsgált ondóminta koncentrációja 8 M/ml spermium volt 0%-os motilitás, 10%-os vitalitás és 77,6%-os DFI mellett. MACS szeparációt követően a vitalitás 73%-ra emelkedett, míg a DFI 28,2%-ra csökkent.

#### 4.4. Fehérvérsejtek mágneses szeparációja

Leukocytospermia esetében CD45+ sejtek kezdeti aránya a teljes sejtszámhoz képest  $6,92 \pm 3,71\%$  volt. Szeparációt követően arányuk szignifikánsan csökkent,  $0,44 \pm 0,39\%$ -ra ( $p < 0,001$ ; 3. ábra).

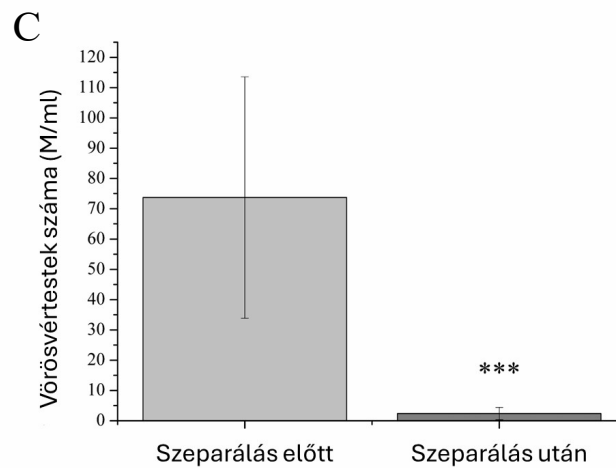
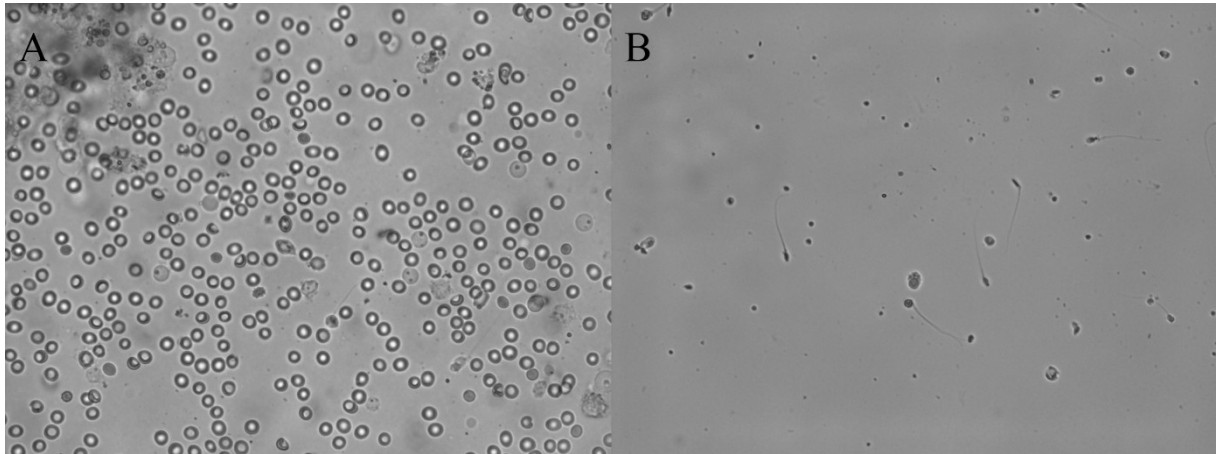


3. ábra: CD45+ sejtek aránya a mágneses szeparáció előtt és után.

\*\*\* $p < 0,001$ ; kétmintás  $t$ -próba.

## 4.5. Vörösvértestek mágneses szeparációja

A feldolgozott hereszövet minták átlagosan  $73,71 \pm 39,85$  M/ml vörösvértestet tartalmaztak. A mágneses szeparációt követően a CD235a+ sejtek száma jelentősen,  $2,39 \pm 2,04$  M/ml-re csökkent a mintában ( $p < 0,001$ ; 4. ábra).



4. ábra: Fénymikroszkópos kép a vörösvértestek számának szemléltetésére a CD235a+ sejtek mágneses szeparációja előtt (A) és után (B). Vörösvértestek száma a szeparáció előtt és után (C).

\*\*\* $p < 0,001$ ; kétmintás  $t$ -próba.

## 5. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

---

Az emberi fajt érintő globális fertilitási krízis megoldása szempontjából esszenciális jelentőségű lenne az egyelőre relatíve alacsony hatékonyságú asszisztált reprodukciós eljárások eredményességének növelése. Ennek egyik kulcsa az ehhez felhasznált minták, ivarsejtek minél magasabb minőségben való biztosítása. Férfi oldalról nézve ez egyrészt a magas DNS integritású spermiumok szelekciójával, másrészt a felhasznált ejakulátumot/hereszövet mintát szennyező sejtek eltávolításával érhető el. Az eddig kifejlesztett spermium szelekciós eljárások egyike sem bizonyult eredményesebbnek a többinél a klinikai végpontok tekintetében, így továbbra is fennáll az igény ezek fejlesztésére.

Jelen értekezésben a fejlett spermium szelekciós módszerek közül a MACS potenciális alternatív alkalmazásai lehetőségeit kívántam részletezni. Az eredeti módszer az apoptotikus jeleket mutató spermiumok membránfelszínén megjelenő PS és az alkalmazott mágneses mikrogöngyök felszínéhez kötött annexin V kötődésén alapul. Az *apoptózis* fogalma a programozott sejthalál fiziológias folyamatát jelöli, mely során a sejt aktív, energia-dependens folyamatokon keresztül, kontrolláltan felszámolja saját struktúráit: a sejt zsugorodni kezd, kromatin állománya kondenzálódik, majd internukleoszómáisan darabolódik. Ezek a DNS töredékek végül a sejtorganelumokkal együtt intakt sejtmembrán által határolt ún. *apoptotikus testekbe* kerülve leválnak a sejtről, majd a környező fagociták bekebelezik őket. Ez utóbbi lépésnek kulcsmomentuma a PS externalizációja, mely egyfajta non-inflammatorikus fagocitózis szignálként funkcionál, szerepe esszenciális az apoptózis maradéktalan lejátódásában (Elmore, 2007; Szeberényi, 2011). Az apoptotikus jeleket (aktivált kaszpázok, externalizált PS, DNS-fragmentáció) mutató spermiumok aránya az ejakulátumban magasabb a meddő férfiak körében (Weng et al., 2002; Hichri et al., 2018). Az apoptotikus jelátviteli utak aktivációjának kifejezett negatív hatásait írták le a spermium fertilizációs potenciáljára nézve: az végrehajtó kaszpáz-3 aktivációja esetén csökkent motilitás, kapacitáció, károsodott akroszóma reakció és oocita penetráció, illetve alacsonyabb fertilizációs ráta észlelhető (Aziz et al., 2007; Grunewald et al., 2008; Grunewald et al., 2009a; Grunewald et al., 2009b; Grunewald et al., 2017).

A MACS spermiumok DNS-fragmentációját csökkentő hatását már korábban is számos tanulmányban igazolták (Said et al., 2006; Aziz et al., 2007; de Vantéry Arrighi et al., 2009; Lee et al., 2010; Zahedi et al., 2013; Bucar et al., 2015; Degheidy et al., 2015; Chi et al., 2016; Martínez et al., 2018). Vizsgálataink kiindulásaként ezt ellenőriztük: a minták annexin V-alapú

szeparálásával a DFI szignifikáns mértékű,  $2,19\times$  csökkenése volt elérhető (1. ábra), az irodalmi adatokkal összhangban, mely valójában nem meglepő jelenség. Ahogy az fentebb tárgyalásra került, az apoptózis folyamatának természetes velejárója a DNS molekula feldarabolódása, fragmentálódása. Az apoptotikus sejtek rendszerből való eliminálásának logikus következménye a DFI csökkenése is.

A súlyos vagy abszolút asthenozoospermia komoly kihívást jelent az asszisztált reprodukciós eljárás során, mivel az élő, de immotilis és az apoptózis vagy nekrozis következtében elpusztult spermiumok elkülönítése (azok károsítása nélkül) igencsak nehezített. A korábban említett technikák (HOST, LAISS, stb.) alkalmazhatósága, biztonságossága és sikeressége egyelőre kérdéses. Megoldást jelenthet élő, alacsony DNS-fragmentációt mutató tesztikuláris spermium nyerése, azonban ez csak műtéti úton (TESE) kivitelezhető, melytől a betegek gyakran idegenkednek (Agarwal et al., 2022). A MACS kapcsán jól ismert DNS-fragmentációt csökkentő hatása, de ezentúl számos tanulmány lelhető fel az irodalomban, mely a magas DNS integritású spermiumok izolálása kapcsán észlelt vitalitást javító effektusról is beszámol (Aitken et al., 2010). Az eddig fellelhető eredményekkel összhangban, vizsgálatunk során negatív korrelációt találtunk a spermiumok vitalitása és a DNS-fragmentációjuk mértéke között (2. ábra). Ezentúl vizsgáltuk ezen két jellemző változásának hatását a klasszikus paraméterekre is. Mind a csökkent vitalitás, mind a magas DFI szignifikáns változásokat eredményezett a vizsgált paraméterekben. A vitalitás csökkenésével együtt jelentősen nőtt a DFI, csökkent a koncentráció, a motilitás és a progresszív motilitás. A DFI növekedése hasonló változásokat eredményezett, leszámítva a koncentráció szignifikáns változását. Ezentúl megfigyelhető, hogy a DFI változása jelentősebben befolyásolta a vitalitást, mint fordítva. A DFI-vitalitás közötti korreláció ugyancsak az apoptózis folyamatában keresendő. A DNS feldarabolódás az apoptózis folyamatának része, mely folyamat végeredménye az adott sejt pusztulása. Tehát egy ondó minta magas DFI értéke tulajdonképpen a programozott sejthalál során fragmentálódott örökítőanyagot mutatja, melynek egyértelmű következménye a csökkent vitalitás. A fentiekben említett összefüggést mi sem szemlélteti jobban, mint a DFI csökkenése a SU tesztet követően, mely szelekciós technika alapvetően az élő, egészséges, motilis spermiumok migrációján alapszik. Az eljárás során a motilis/élő frakció elválasztódik az immotilis/potenciálisan elhaltól, ezáltal nagyméretékben nő a vitalitás, és a fentiek szerint, csökken a DNS-fragmentáció (Jayaraman et al., 2012; Oguz et al., 2018; Muratori et al., 2019; Viswambharan and Murugan, 2021). Ezt jelenséget hasznosítják a mikrofluidikai szeparációs chippek (pl. ZyMōt™), melyek csökkentik a DFI-t, növelik a motilitást, és ezek által a vitalitást is (Parrella et al., 2019). Sajnálatos módon ezen eljárások nem működőképesek döntő részben

immotilis spermium populáció esetén. A fentiek alapján egy további nagyon fontos következtetés vonható le: a jelenlegi DNS-fragmentációs tesztek eredményének értékelésekor figyelembe kell venni, hogy ezek egy összesített értéket tükröznek, mivel az non-viabilis spermiumok adatait is tartalmazzák, így félrevezetőek lehetnek. Ezáltal a DF tesztek hasznos információt adnak a természetes fertilitásról, azonban pontatlanok lehetnek az intrauterine inszemináció (IUI)/in vitro fertilizáció (IVF)/ICSI eredményének prediktálásában. Az IUI/IVF/ICSI ciklusok során a spermiumok előkészítéseként valamelyik konvencionális szelekciós eljárást (SU/DGC) alkalmazzák, mely már önmaga csökkenti a DFI-t és javítja a vitalitást és a motilitást (Jayaraman et al., 2012; Oguz et al., 2018; Muratori et al., 2019; Viswambharan and Murugan, 2021). Emiatt a DF tesztek eredménye és az IVF/ICSI ciklusok kimenetele alapján egyértelműen nem határozható meg a DNS-fragmentáció hatása a klinikai terhességi ráta, a vetelési ráta és a LBR vonatkozásában. Összegezve, a DNS-fragmentáció hatása a klinikai végpontokra mindeztáig tisztázatlan, további RCT-k, metaanalízisek szükségesek (Chen et al., 2020). A MACS az eddigi tanulmányok alapján biztonságos módszernek mondható (Gil Juliá et al., 2023), azonban a mágneses tér spermiumokra gyakorolt potenciális hatásai és ezek szerepe az asszisztált reprodukció kimenetelében további vizsgálatokat igényel.

A fentiekben részletezett DNS-fragmentáció-vitalitás közötti erős korreláció alapján egy fragmentációt csökkentő eljárás alkalmas lehet a vitalitás növelésére. A MACS szeparáció alkalmasnak bizonyult erre a célra: vizsgálatunkban az abszolút asthenozoospermias minta vitalitása 7,3×-ra nőtt az annexin V-alapú mágneses szeparálást követően. Habár a vitalitás 100%-ra nem volt emelhető és a szeparálás után a spermiumok továbbra is mozdulatlanok voltak, a módszer statisztikai szempontból jelentősen növeli a viabilis spermiummal való megtermékenyítés esélyét. Ezzel párhuzamosan, a korábban említett irodalmi adatokkal összehangban, jelentős csökkenést tudunk kimutatni a minta DFI-ében (77,6% vs. 28,2%). Az általunk alkalmazott módszer TESE minták esetében is hatékony lehet, ahol éretlen tesztikuláris spermiumokról lévén szó, szintén nem található motilis spermium. A vizsgálat limitációját az abszolút asthenozoospermia ritka előfordulásából adódó esettanulmány jellege adja.

Az eredeti, annexin V alapú módszer módosításával, a mikrogyöngyök felszínéhez kötött más molekulákkal (antitestekkel) egyéb sejtfelszíni markerek által célsejtek (magas minőségű spermiumok) feldúsításán túl a mintában lévő nem kívánatos, szennyező sejtek eliminációjára is lehetőség adódik.

A CD45 molekula egy közös leukocita antigénnek is nevezett membrán glikoprotein, mely minden érett magvas hemopoetikus sejt felszínén fellelhető, ezáltal alkalmas a

leukocitospermiás ejakulátumot szennyező fehérvérsejtek eltávolítására, melyek káros hatásokat fejtenek ki a fertilitásra: Fraczek és mtsai. 2016-os tanulmányukban izolált leukocitospermiás ondó mintákat vizsgálva csökkent spermium koncentrációt, teljes és progresszív motilitást, illetve emelkedett malondialdehid (MDA) szinteket észleltek a kontrollokhöz képest, mely utóbbi a lipidperoxidáció egyik biokémiai markere. Úgy tűnik, hogy míg bakteriospermia esetén az apoptózis mitokondriális útja aktiválódik és az intracelluláris ROS szint emelkedik, addig leukocitospermia során inkább a fehérvérsejtek (főként neutrofil granulociták) által generált ROS okozta direkt celluláris károsodás, lipidperoxidáció dominál (természetesen egy ondoúti fertőzés esetében leukocitospermia-bakteriospermia együttes jelenléte esetén ezek a hatások kombinálódnak). Tekintettel arra, hogy sejtmembránjuknak extrém magas (kb. 50%) a könnyen oxidatív reakcióba lépő többszörösen telítetlen zsírsav tartalma, a spermiumok különösen sebezhetőek a lipidperoxidáció szempontjából, mely által csökken a sejtmembrán és az intracelluláris organelumok membránjának fluiditása. Ez alapvetően károsítja a spermium olyan kardinális funkcióit, mint a kapacitáció, az akroszóma reakció, a spermium-oocita fúzió és a különféle receptor mediált jelátviteli utak normál működése. Ezentúl a képződő végtermékek (pl. MDA) DNS adduktokat képeznek, ezáltal indirekt genotoxikus hatást is kifejtve a ROS direkt DNS károsító hatásán túl (Henkel, 2024). Az aktivált fehérvérsejtek proinflammatorikus citokineket is expresszálnak (interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )), melyek negatív asszociációt mutatnak a spermium koncentrációval, teljes és progresszív motilitással, vitalitással és a DNS integritással (Eggert-Kruse et al., 2001; Koçak et al., 2002; Martínez et al., 2007). Mindezek alapján nyilvánvaló, hogy a felhasználni kívánt ejakulátumot szennyező fehérvérsejtek eliminációja előnyös lehet a reprodukciós eljárás eredménye szempontjából.

Vizsgálatunkban a CD45 alapú szeparáció által a leukociták százalékos arányának szignifikáns,  $15,73\times$  csökkenése volt elérhető leukocitospermiás ondómintákban (3. ábra). A módszer limitációját jelentheti az antitest kötődés által indukált esetleges aktiváció és ROS termelés, ennek spermiumokra kifejtett esetleges káros hatásai további vizsgálatokat igényelnek.

Vörösvértetek jelenléte a reprodukciós eljárás során felhasznált ondó, illetve hereszövet mintákban több szempontból is kedvezőtlen. Egyrészt jelentősen nehezítik a spermium izolálását az embriológus számára. Másrészt esetleges citolízisük (pl. eritrocita-lízis puffer alkalmazásakor, fagyasztott minta felolvasztását követően) következtében felszabaduló szabadgyökök oxidatív stresszt, direkt citotoxikus hatást is jelentenek (Rijsselaere et al., 2004; Yazdinejad et al., 2020). Ezentúl kimutatták, hogy maga az eritrocita-lízis puffer is toxikus lehet

a spermiumok számára: egyrészt a vörösvértestek lízisében szerepet játszó Band 3 anion csatorna a spermiumok membránjában is megtalálható, másrészt ha a puffer oldat ozmolaritása jelentősebben eltér a médiumétól, az ozmotikus sokkot okozhat (Yazdinejad et al., 2020). Az általunk használt CD235a alapú mágneses szeparálás során a TESE során nyert hereszövet mintákat szennyező vörösvértestek nagyfokú ( $30,8\times$ ), sikeres kivonása vált lehetővé (4. ábra). Az eddig rendelkezésre álló irodalom részletes áttekintése alapján kutatócsoportunk elsőként közölte vörösvértestek mágneses szeparálás általi eliminációját ondó/TESE minták esetében.

Amennyiben rendelkezésünkre állna a legjobb minőségű (legmagasabb DNS integritású) spermium szubpopulációra jellemző molekuláris marker, azt targetként felhasználva lehetséges lenne a MACS technológia továbbfejlesztése ezen sejtek csoportjának pozitív szelekcióját célozva. A tömegspektrometriás képzéskötés (MALDI) egy értékes eszköz lehet ilyen molekulák kutatásában, melyet limitál a módszer magas költsége és hozzá szükséges magas fokú képzettség, szakértelem. A jövőben a fertilizációra legideálisabb spermium kiválasztásában hatékony, hasonló technológián alapuló, rutin pozitív szelekciós technika véleményünk szerint hozzájárulhatna az ART eredményességének javításához. Adams és mtsai. 2008-ban írtak le, majd validáltak egy ún. multitarget MACS módszert, mely kombinálja a mágneses alapú szeparálást a mikrofluidikai technológiával egy chip-alapú platformon, lehetővé téve bakteriális sejtek magas szelektivitású szeparációját többféle sejt felszíni marker alapján. Elképzelhető, hogy hasonló elven a magas fertilizációs potenciállal bíró spermiumok és a szennyező sejtek szeparációja akár együlésben is elvégezhetővé válhatna.



## 6. TÉZISEK

---

1. Ismételten igazoltuk, ezáltal alátámasztottuk az irodalomban már ismert, az MACS-annexin V rendszer spermiumok DNS-fragmentációt csökkentő hatását.
2. Eredményeinkkel alátámasztottuk a DNS-fragmentáció és a vitalitás közti erős negatív korrelációt, illetve igazoltuk ezek hatását a klasszikus paraméterekre (spermium koncentráció, motilitás, progresszív motilitás).
3. Az eddigi irodalom alapján elsőként alkalmaztuk az annexin V alapú MACS szeparálást az ondóminta vitalitásának emelésére (és ezáltal DFI csökkentésére) ritka abszolút asthenozoospermia kapcsán.
4. CD45 molekulát célzó mágneses mikrogyöngyöket alkalmazva a szennyező fehérvérsejtek arányának szignifikáns csökkenését értük el leukocitospermiás ondómintákban.
5. CD235a molekulát célzó mágneses mikrogyöngyöket alkalmazva a szennyező vörösvértestek arányának szignifikáns csökkenését értük el TESE során nyert hereszövet mintákban, legjobb tudomásunk szerint eddig elsőként alkalmazva ezt a módszert.

## 7. KÖZLEMÉNYEK

---

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Czétány P**, Balló A, Márk L, Török A, Szántó Á, Máté G. An Alternative Application of Magnetic-Activated Cell Sorting: CD45 and CD235a Based Purification of Semen and Testicular Tissue Samples. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 24; 25(7):3627. **Q1, IF: 4,9**

Máté G, Balló A, Márk L, **Czétány P**, Szántó Á, Török A. Magnetic-Activated Cell Sorting as a Method to Improve Necrozoospermia-Related Asthenozoospermic Samples. *J Clin Med.* 2022 May 21; 11(10):2914. **Q1, IF: 3,0**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **7,9**

Kumulatív impakt faktor: **35,2**

Citációk: **41**

### Egyéb közlemények:

Illés A, Opper B, Reglődi D, Kerényi M, **Czétány P**, Boronkai Á, Schäfer E, Tóth G, Fábíán E, Horváth G. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on small intestinal INT 407 cells. *Neuropeptides.* 2017 Oct; 65:106-113. **Q2, IF: 2,5**

Sarlós DP, **Czétány P**. Új laparoszópos vesetumor-reszekció gyakorló modell kifejlesztése. *Magyar Urológia.* 2018; 30(1): 8-11.

Horváth G, Reglődi D, **Czétány P**, Illés A, Rémán G, Fekete A, Tóth G, László E, Opper B. Effects of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in Human Proximal Tubule Cells Against Gentamicin Toxicity. *Int J Pept Res Ther.* 2019; 25, 257–264. **Q3, IF: 2,0**

**Czétány P**, Gitta S, Balló A, Sulc A, Máté G, Szántó Á, Márk L. Application of Mass Spectrometry Imaging in Uro-Oncology: Discovering Potential Biomarkers. *Life (Basel).* 2022 Mar 3; 12(3):366. **Q2, IF: 3,2**

Balló A, Busznyákné Székvári K, **Czétány P**, Márk L, Török A, Szántó Á, Máté G. Estrogenic and Non-Estrogenic Disruptor Effect of Zearalenone on Male Reproduction: A Review. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 13; 24(2):1578. **Q1, IF: 4,9**

Balló A, **Czétány P**, Busznyákné KS, Márk L, Mike N, Török A, Szántó Á, Máté G. Oxidoreduction Potential as a Method to Determine Oxidative Stress in Semen Samples. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 26; 24(15):11981. **Q1, IF: 4,9**

Gitta S, Szabó É, Sulc A, **Czétány P**, Máté G, Balló A, Csabai T, Szántó Á, Márk L. Investigation of Phosphatidylcholine by MALDI Imaging Mass Spectrometry in Normal and IVF Early-Stage Embryos. *Int J Mol Sci.* 2024 Jul 6; 25(13):7423. **Q1, IF: 4,9**

Sulc A, **Czétány P**, Máté G, Balló A, Semjén D, Szántó Á, Márk L. MALDI Imaging Mass Spectrometry Reveals Lipid Alterations in Physiological and Sertoli Cell-Only Syndrome Human Testicular Tissue Sections. *Int. J. Mol. Sci.* 2024 Jul 31; 25(15):8358. **Q1, IF: 4,9**

Bányai D, Sarlós DP, Belák M, **Czétány P**, Szántó Á. Robotasszisztált parciális nefrektómia műtétekkel szerzett kezdeti tapasztalataink. *Magy Onkol.* 2024 Sep 19; 68(3):243-247.

**Czétány P**, Balló A, Szántó Á. A heretumor mikroreszekció bevezetése és eddigi eredményei Pécsen. *Magyar Urológia.* 2024; 36(3): 139-142.

## 8. KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK

---

**Czétány P**, Balló A, Kádár Zs, Damásdi M, Kenyeres B, Szántó Á. Fournier-gangraena acut ellátása és reconstructio fiatal fertilis korú férfinél.

Magyar Urológus Társaság XXIV. Kongresszusa, Eger, 2019.10.11. (poszter)

Magyar Andrológus Társaság XII. Kongresszusa, Zalakaros, 2019.12.05.

**Czétány P**, Pusztai Cs, Szántó Á. Retroperitonealis fibrosis okozta ureter obstructio laparoscopos megoldása. Magyar Urológus Társaság XXV. Kongresszusa, 2020.10.08.

**Czétány P**, Pusztai Cs, Szántó Á. Posztkemoterápiás laparoszkoos retroperitonealis lymphadenectomia – műtéti bemutató. XXXIV. Fűvészkerti Urológus Napok, 2021.02.20.

**Czétány P**, Balló A, Pytel Á, Szántó Á. Diagnosztikus „enigma”: szegmentális hereinfarktus esete.

Magyar Andrológus Társaság XIV. Kongresszusa, Kecskemét, 2022.09.22.

Magyar Urológus Társaság XXVII. Kongresszusa, Siófok, 2022.10.07.

Central European Meeting 23, Krakkó, 2023.03.24-25. (poszter)

**Czétány P**. Case presentation at the European School of Urology, Siófok, Hungary, 2022.10.08.

**Czétány P**, Bányai D. Ismeretlen dignitású vesicula seminalis/prostaticus térfoglalás laparoscopos ellátása. Magyar Urológus Társaság XXVIII. Kongresszusa, Budapest, 2023.10.12.

**Czétány P**, Balló A. A heretumor microresectio bevezetése, 2018-2023 közötti eredményei Pécsen

Magyar Andrológus Társaság XV. Kongresszusa, Kecskemét, 2023.11.23.

Central European Meeting 24, Bécs, 2024.04.26-27. (poszter)

**Czétány P**. A lokálisan előrehaladott prosztaták kezelése. XIV. „Minimál invazív eljárások az urológiában” konferencia. Budapest, 2024.02.22.

## 9. TÁMOGATÁS

---

Jelen munkámat a Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium keretein belül az Andrológiai Kutatócsoport tagjaként, a program támogatásával végeztem.

RRF-2.3.1-21-2022-00012, azonosítószámú, Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium megnevezésű projekt a Széchenyi Terv Plusz program keretében, az Európai Unió Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszközének támogatásával valósul meg.

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Dr. Szántó Árpád Tanár Úrnak, aki klinikaigazgatóként lehetővé tette kutatási tevékenységemet gyógyító és oktató feladataim mellett, hálás vagyok témavezetőként nyújtott támogatásáért és nem utolsósorban mentoromként a „keresztutaknál” adott iránymutatásaiért, tanácsaiért.

Köszönet illeti Dr. Máté Gábort, aki témavezetőként megismertetett a meddőségi kutatások alapvető módszertanával, tudományos munkámat mindvégig irányította.

Köszönöm Dr. Balló András folyamatos támogatását a klinikai andrológia alapjainak elsajátításában.

Köszönet kutatótársaimnak a Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium andrológiai munkacsoportjában.

Köszönettel tartozom a PTE KK Urológiai Klinika és a Dunamenti Reprodukciós Központ Pannon Telephely munkatársainak a kutatásban nyújtott segítségükért.

Végül hálás vagyok családomnak, szüleimnek, testvéremnek, de legfőbbképp feleségemnek, Klárinak szeretetükért, töretlen támogatásukért.

*Munkámat a meg nem született gyermekeknek ajánlom.*