

---

# A mágneses sejtszeparálás alternatív alkalmazási lehetőségei az asszisztált reprodukció során

---

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Czétány Péter

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Urológiai Klinika



Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Reproduktív Endokrinológia Program

Iskolavezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Dr. Kovács Kálmán

Témavezetők: Dr. Szántó Árpád

Dr. Máté Gábor

Pécs, 2024

# Tartalomjegyzék

---

1.	Bevezetés .....	7
1.1.	A meddőség epidemiológiája, etiológiája.....	7
1.2.	WHO irányelvek szerinti spermaanalízis, klasszikus paraméterek.....	9
1.3.	Sebészi spermiumnyerés .....	11
1.4.	Asszisztált reprodukciós technikák.....	13
1.4.1.	Intrauterin inszemináció (IUI).....	13
1.4.2.	In vitro fertilizáció (IVF) .....	13
1.4.3.	Intracitoplazmatikus spermium injekció (ICSI).....	14
1.5.	Spermium szelekció .....	15
1.5.1.	Konvencionális technikák.....	15
1.5.2.	Fejlett technikák .....	16
1.5.2.1.	Mágneses sejt szeparálás (MACS).....	17
1.6.	Abszolút asthenozoospermia .....	20
1.7.	Leukocitospermia jelentősége .....	21
1.8.	Hemospermia és a hereszövet mintákat szennyező vörösvértetek jelentősége .....	22
1.9.	Cluster of differentiation .....	23
1.9.1.	CD45.....	23
1.9.2.	CD235a.....	23
2.	Célkitűzések .....	24
3.	Anyagok és módszerek .....	25
3.1.	Mintagyűjtés, alapvizsgálatok .....	25
3.2.	Apoptotikus spermiumok mágneses szeparációja.....	26
3.3.	Fehérvérsejtek mágneses szeparációja.....	27
3.4.	Vörösvértetek mágneses szeparációja .....	27
3.5.	Vegyszerek.....	28
3.6.	Statisztikai analízis.....	28
4.	Eredmények .....	29
4.1.	Magas DNS-fragmentációjú spermiumok mágneses szeparálása.....	29
4.2.	A vitalitás, DNS-fragmentáció és klasszikus sperma paraméterek közötti lehetséges összefüggések vizsgálata.....	30
4.3.	Abszolút asthenozoospermias minta mágneses szeparációja .....	32
4.4.	Fehérvérsejtek mágneses szeparációja.....	33
4.5.	Vörösvértetek mágneses szeparációja .....	34
5.	Megbeszélés és következtetések .....	35
6.	Összegzés.....	43

7.	Közlemények .....	44
8.	Kongresszusi előadások.....	46
9.	Irodalomjegyzék.....	47
10.	Ábrák, táblázatok jegyzéke.....	66
11.	Támogatás.....	68
12.	Köszönetnyilvánítás .....	69

## Rövidítések jegyzéke

---

AIF:	apoptosis inducing factor
Apaf-1:	apoptotic protease activating factor-1
ART:	assisted reproductive techniques
Bcl-2:	B cell lymphoma/leukemia type 2
BPA:	bisphenol A
BSA:	bovine serum albumin
CASA:	computer assisted sperm analysis
CBVDA:	congenital bilateral vas deferens agenesis
CD:	Cluster of Differentiation
CI:	confidence interval
cTESE:	conventional testicular sperm extraction
DFI:	DNA-fragmentation index
DGC:	density gradient centrifugation
DTT:	dithiothreitol
EAU:	European Association of Urology
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
ESHRE:	European Society of Human Reproduction and Embryology
FITC:	fluorescein isothiocyanate
FR:	fertilisation rate
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
MA:	maturation arrest
MACS:	magnetic activated cell sorting
MALDI:	matrix-assisted laser desorption/ionization
MDA:	malondialdehyd
MESA:	microsurgical epididymal sperm aspiration
MSOME:	motile sperm organelle morphology examination
mTESE:	microdissectional testicular sperm extraction
NOA:	non-obstructive azoospermia
NP:	non-progressive (motile sperm)
OA:	obstructive azoospermia
OAT:	oligo-astheno-teratozoospermia
OFNA:	open fine needle aspiration
PBS:	phosphate-buffered saline
PCOS:	polycystic ovary syndrome
PESA:	percutaneous epididymal sperm aspiration
PI:	propidium iodide
PICSI:	physiological intracytoplasmic sperm injection
PMN:	polimorphonuclear
PR:	progressive (motile sperm)
PS:	phosphatidyl-serin
RCT:	randomised controlled trial
ROS:	reactive oxygen species
SCD:	sperm chromatin dispersion
SCOS:	Sertoli cell only syndrome
Smac/DIABLO:	second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI
SRR:	sperm retrieval rate
STH:	seminiferous tubule hyalinisation

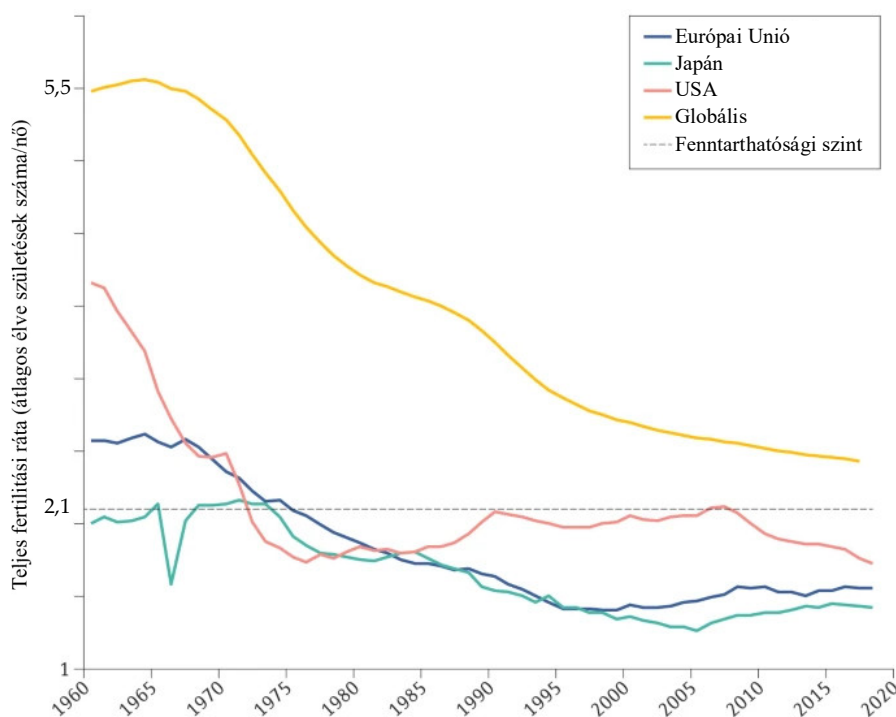
SU:	swim up test
TESA:	testicular sperm aspiration
TESE:	testicular sperm extraction
TFF:	total fertilisation failure
TNF- $\alpha$ :	tumor necrosis factor- $\alpha$
TUNEL:	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TURED:	transurethral resection of the ejaculatory ducts
WHO:	World 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 [1]. 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 (1. ábra). Ebben szerepet játszhat a férfiak sperma paramétereinek (volumen, teljes spermiumszám, koncentráció, motilitás, morfológia) világszerte észlelt romlása is [2–5], mely szintén a 20. század második felétől kezdődően észlelhető. Levine és mtsai. által egy 2017-ben készített metaanalízis [6] alapján 1973 és 2011 között a spermiumszámban 50-60%-os csökkenés mérhető az Észak-Amerikai, Európai, illetve Ausztráliai férfi populáció körében.



1. ábra: Globális fertilitási trendek 1960-2018 [7]

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.) [8]. Utóbbiakhoz kapcsolódóan fontos kiemelni az ún. *endokrin disruptorokat*. Ezek olyan kémiai ágensek (pesticidek, 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 [9].

*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 [10] 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 [11]. Esetükben kb. 30-50%-ban találjuk férfi eredetű faktor jelenlétét [12], melynek vizsgálata és kezelése az andrológia tárgykörébe esik.

Diagnózis	Százalékos előfordulás (%)	
	Összes beteg (n=12945)	Azoospermias betegek (n=1446)
<i>Összes beteg</i>	100	11,2
<i>Meddőség - ismert ok</i>	42,6	42,6
Cryptorchismus	8,4	17,2
Varicocele	14,8	10,9
Spermium auto-antitestek	3,9	-
Heretumor	1,2	2,8
Egyéb	5,0	1,2
<i>Idiopátiás meddőség</i>	30,0	13,3
<i>Hipogonadizmus</i>	10,1	16,4
Klinefelter-szindróma (47, XXY)	2,6	13,7
XX férfi	0,1	0,6
Primer hipogonadizmus ismeretlen okból	2,3	0,8
Szekunder (hipogonadotrop) hipogonadizmus	1,6	1,9
Kallmann-szindróma	0,3	0,5
Idiopátiás hipogonadotrop hipogonadizmus	0,4	0,4



Diagnózis	Százalékos előfordulás (%)	
	Összes beteg (n=12945)	Azoospermiás betegek (n=1446)
Hipofízis műtét után	< 0,1	0,3
Late-onset hipogonadizmus	2,2	-
Késői pubertás	1,4	-
Egyéb	0,8	0,8
<i>Szisztémás betegség</i>	2,2	0,5
<i>Malignus betegség miatti krioprezerváció</i>	7,8	12,5
Heretumor	5,0	4,3
Limfóma	1,5	4,6
Leukémia	0,7	2,2
Szarkóma	0,6	0,9
<i>Erekciós/ejakulációs zavar</i>	2,4	-
Obstrukció	2,2	10,3
Vazektómia	0,9	5,3
Cisztás fibrózis (kongenitális bilaterális ductus deferens agenézia)	0,5	3,0
Egyéb	0,8	1,9

1. táblázat: Férfi meddőség okai és százalékos eloszlása [13,14]

## 1.2. WHO irányelvek szerinti spermaanalízis, klasszikus paraméterek

A meddő párok férfi tagjának teljes andrológiai kivizsgáláson szükséges részt vennie (a női tag részletes nőgyógyászati kivizsgálásával párhuzamosan), ennek része a részletes anamnézis, fizikális és ultrahang vizsgálat, nemi hormonok vizsgálata, spermaanalízis és szükség esetén további kiegészítő vizsgálatok (pl. genetikai vizsgálatok, képpalkotás) [14,15]. A spermaanalízis a korrekt andrológiai vizsgálat egyik sarokköve, módszertani standardizálása már 1980-ban, az első WHO irányelvek és referencia értékek megjelenésével megtörtént [16]. Azóta ezeknek nagyjából 8-10 évente, összesen öt alkalommal történt revíziója, jelenleg a 2021-ben kiadott hatodik kézikönyv van érvényben (*WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th. ed.* [17]). A kézikönyv ajánlásokat fogalmaz meg az ejakulátum és a spermiumok alap- és kiterjesztett vizsgálatának előkészítéséről, pontos módszertanáról, továbbá referencia értékeket ad ezeknek az ún. *klasszikus paramétereivel* (más néven, összefoglalva *spermatogram*) kapcsolatban. A klasszikus paramétereket a spermiumok előkészítését követően fénymikroszkóppal és Neubauer-kamrával végzett alapvizsgálata során határozzuk meg, ezek a *spermiumszám, koncentráció, motilitás, morfológia és vitalitás* (utóbbi meghatározása csak 40% alatti teljes motilitás esetén kötelező). Az ezekkel kapcsolatos határértékek 3500 fertilis férfi paramétereinek elemzése alapján kerültek megállapításra, az

ebben a populációban mért 5. percentilisnek megfelelő értékekből adódnak, ezeknél alacsonyabb értékek esetén általában csökkent termékenységgel számolhatunk (1. táblázat). A határérték alatti paramétereket külön névvel is jelöljük: csökkent koncentráció esetén *oligozoospermia*, csak centrifugálást követően megjelenő spermiumok esetén *cryptozoospermia*, a spermiumok ejakulátumban való teljes hiánya esetén *azoospermia*, csökkent motilitás esetén *asthenozoospermia*, határérték alatti normál alak esetén *teratozoospermia*, végül csökkent vitalitás esetén *necrozoospermia* a megfelelő elnevezés. Ezek az eltérések természetesen egyidejűleg, egymással kombinálódva is előfordulhatnak (*oligo-astheno-teratozoospermia/OAT sy.*).

Paraméter	2021-es alsó ref. határ (95% CI)
Ondó térfogat (ml)	1,4 (1,3-1,5)
Spermiumszám ( $\times 10^6$ /teljes ejakulátum)	39 (35-40)
Spermium koncentráció ( $\times 10^6$ /ml)	16 (15-18)
Motilitás (progresszív (PR)+nem progresszív (NP), %)	42 (40-43)
Progresszív motilitás (PR, %)	30 (29-31)
Vitalitás (élő sejtek aránya, %)	54 (50-56)
Morfológia (normális alakok aránya, %)	4 (3,9-4,0)

2. táblázat: Klasszikus paraméterek alsó referencia határai (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th edition, 2021 alapján [17])

Azoospermia esetén 40 %-ban ondóúti elzáródás, ürülési zavar áll a háttérben (*obstruktív azoospermia/OA*), mely esetén amennyiben rekonstrukció kivitelezhető, megjelenhet spermium az ejakulátumban, illetve sebészi módszerekkel jó eredménnyel nyerhető spermium ART-hoz való felhasználásra. 60 %-ban *non-obstruktív azoospermia*ról (*NOA*) beszélünk, melynek kezelése általában komoly kihívás elé állíthatja a reprodukciós team-et [18]. Nagyjából 30-40%-ban az abnormalis spermatogram mellett az elvégzett fizikális, képalkotó, labor, illetve genetikai vizsgálatok során azt magyarázó eltérést nem találunk, ilyenkor *idiopátiás meddőségről* beszélünk. A háttérben felmerül az endokrin diszruptorok, az oxidatív stressz, a DNS-fragmentáció, eddig nem vizsgált genetikai és epigenetikai eltérések szerepe [19]. Amennyiben a beteg spermaképében sem találunk eltérést, *ismeretlen eredetű meddőségről* beszélünk, ez a betegek kb. 20-30%-ban fordul elő [14].

### 1.3. Sebészi spermiumnyerés

Azoospermia esetén az asszisztált reprodukciós eljárásokhoz használható spermium csak invazív beavatkozás útján, közvetlenül a heréből (OA esetén, amennyiben az elzáródás szintje a herétől disztálisan található, a mellékheréből is) nyerhető. További indikációt jelenthet sebészi spermiumnyerésre az anejaculatio, ha a betegől vibrostimuláció/elektroejakuláció útján sem lehet ondóváladékot nyerni, az abszolút astheno-/necrozoospermia, illetve a terápia-rezisztens magas DNS fragmentáció [20,21].

A teljesség kedvéért fontos megjegyezni, hogy OA esetében (pl. korábbi vasectomia, epididymis talaján kialakult elzáródás, ductus ejaculatoriust komprimáló középvonali ciszta) lehetőség adódhat az ondóúti elzáródás sebészi megoldására is rekonstruktív műtét által (mellékhere szintű elzáródás esetén *tubulovasostomia*, ductus deferens szintű esetén *vasovasostomia*, ductus ejaculatorius szintű esetén *transurethralis resectio (TURED)*), amennyiben a női partner jó ovariális rezervvel rendelkezik. Ezekben az esetekben is szükséges azonban a rekonstruktív beavatkozással együlésben spermium sebészi extrakciója krioprezerváció, esetleges későbbi felhasználás céljára. Ezentúl ezen eljárások speciális szakértelmet, a vasovasostomia és a tubulovasostomia mikrosebészeti képzettséget is igényel, így általában csak centrumokban végezhetőik sikerrel. Végül az OA néhány speciális esetében (pl. kongenitális kétoldali ductus deferens agenézia (CBVDA)) rekonstrukció egyáltalán nem jön szóba [14,22].

A mellékheréből való spermiumnyerés esetén a legegyszerűbb megközelítés a perkután aspiráció (*percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA*), melynek előnye a gyors, egyszerű, minimál invazív procedúra, hátránya a pontatlanság és az erek esetleges sérülése esetén a minta vörösvértestekkel való szennyeződése. Ezenkívül lehetséges scrotalis explorációt követően a mellékherét előemelve, annak tágult ductusait pungálva nyílt finomtű aspiráció (*open fine needle aspiration, OFNA*) elvégzése, illetve a mellékhere csatornák mikrosebészeti feltárása (*microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA*). Ez utóbbi technikák segítségével precíz módon, vérrel kevésbé szennyezett, nagyobb mennyiségű hímivarsejt nyerhető, azonban a PESA-hoz képest nagyobb invazivitást jelentenek, nagyobb az eszközigényük (MESA esetén operációs mikroszkóp is), ennél fogva költségesebbek.

NOA esetén a herében többféle hisztopatológiai mintázat fordulhat elő: *hipospermatogenezis*, mely a germinális epitélium csökkent cellularitását jelenti, de minden fázisnak megfelelő sejt fellelhető, érésgátlás többnyire a primer és szekunder spermatocitának megfelelően (*maturation arrest, MA*), *Sertoli cell only-szindróma (SCOS)*, mely esetén

kizárólag Sertoli-sejtek lelhetőek fel a tubulusban, a germinális sejtek teljesen hiányoznak, végül a tubulusok hialinizációja (*seminiferous tubule hyalinisation, STH*), mely a tubulusok végstádiumú károsodását jelöli, ekkor lumenük már csak fibroblasztok és kollagén rostok által kitöltött. Ezek a mintázatok nem homogéneken, hanem legtöbbször egymással keveredve jelennek meg [23,24]. Fontos megjegyezni, hogy mellettük közel normális, ún. *fokális spermatogenezis*, teljes kiérés is megjelenhet szigetszerűen, egy-egy tubulusban, melyek így általában megjelenésükben nagyobbak, vaskosabbak, kevésbé átlátszóak, NOA esetén végzett tesztikuláris spermiumnyerés során ezeket célozzuk [25].

A heréből való sebészi spermiumnyerés során lehetőség van aspirációs technika alkalmazására (*testicular sperm aspiration, TESA*), mely obstrukció esetén alkalmazható, azonban NOA esetén az extrakciós technikákhoz (*testicular sperm extraction, TESE*) viszonyított alacsony sikerrátája okán jelenleg már nem ajánlott. Az ún. *konvencionális TESE (cTESE)* során scrotalis behatolásból a hereburkokon áthatolunk, majd a herét előemelve annak tunica albuginea-ján ejtünk bemetszést, ezen keresztül hereszövet mintát metszünk ki, melyből a későbbiekben spermiumok izolálhatóak. A cTESE helyett a magasabb spermiumnyerési ráta (*sperm retrieval rate, SRR*) okán általában ún. *multifokális random TESE* végzendő, amennyiben mikrosebészeti armamentárium, szakértelem nem áll rendelkezésre [26]. Ennek során az alsó, középső, illetve a felső harmadnak megfelelően is egy-egy apró metszésből több mintát veszünk. NOA esetén a sebészi spermium nyerés arany standardját a jelenleg érvényben lévő európai irányelvek alapján (*European Association of Urology (EAU), Guidelines on Sexual and Reproductive Health* [14]) a mTESE (*microdissectional TESE*) jelenti. A technika először Peter Schlegel által került leírásra 1999-ben [25]. A műtét operációs mikroszkóp segítségével, 20-25× nagyítás alatt történik, a here középső harmadában a tunica albugineán ún. *ekvatoriális* metszést ejtünk, majd a vastagabb, tágabb tubulusokat keresve, mikrodisszekciójukkal azokat egyenként emeljük ki a hereszövetből. Ezáltal precízebb, kisebb szöveti traumát jelentő beavatkozás végezhető, mely kevesebb szövődmény (vérzés, hematóma, késői fibrózis, primer hipogonadizmus, stb.) mellett magasabb SRR-t eredményez, bár utóbbi megállapítás továbbra is alacsony evidencia szinten alapszik, további vizsgálatokat igényel. Bernie és mtsai. által 2015-ben közzétett metaanalízis alapján a mTESE SRR-ja jelentősen felülmúlja a cTESE eredményeit (52% vs. 35%) [27]. Ezzel szemben Corona és mtsai. 2019-ben végzett metaanalízisükben nem találtak különbséget a két technika sikerrátája között [28]. Az rendelkezésre álló irodalom alapján úgy tűnik, hogy a szövettani képet illetően a mTESE főként SCOS és kisebb mértékben hipospermatogenezis esetén jelent előnyt, míg érésátlás esetében

nem [29,30]. A vitatható előnyök ellenére az egyértelmű alacsonyabb szövődményráta való tekintettel az EAU irányelvei szerint a mTESE a választandó technika NOA esetén [14].

## 1.4. Asszisztált reprodukciós technikák

Az ART alatt több terápiás modalitást értünk, melyek invazívitásukban és a fertilizációs folyamat feletti kontroll mértékében jelentősen különböznek. A következőkben röviden, kizárólag az értekezés megértéséhez szükséges mértékben ezeket részletezem [13,31,32].

### 1.4.1. Intrauterin inszemináció (IUI)

Az IUI a fertilis spermiumok oocita közelébe jutását, koncentrálódását biztosítja az ovuláció idején a tuba uterinában. A technika által az esetlegesen akadályt jelentő anatómiai barrierek (vagina, cervix) áthidalhatók, mely például cervikális faktor infertilitás (abnormális cervikális nyák, cervikális sztenózis, spermium ellenes antitestek, stb.) esetén jelenthet megoldást. Ezentúl néhány férfi eredetű faktor (pl. súlyos hipospadiázis, retrográd ejakuláció, erektilis diszfunkció) esetében is hatékony lehet, ahol a spermiumok célba juttatása zavart szenved. A beavatkozás során kis mennyiségű (kb. 0,2-0,5 ml) előkészített spermium kerül injektálásra egy vékony katéteren keresztül az uterus ürterébe. Donor spermium felhasználása esetén is elsősorban ez a technika kerül alkalmazásra. A módszer előnye egyszerűsége, alacsony költség- és eszközigénye, a természetes szelekciós hatások többségének megtartása, hátránya alacsony sikerrátája, illetve, hogy súlyosabb/speciális esetekben (pl. azoospermia, 100% immotilis spermiumok, tubáris eredetű meddőség) esetén nem alkalmazható.

### 1.4.2. In vitro fertilizáció (IVF)

Az IVF során az ovulációt megelőzően az oocita az érett tüszőből leszívásra kerül és a nő testén kívül, mesterséges környezetben („lombikban”), speciális tenyésztő médiumban zajlik tovább a fejlődése, ahol a megtermékenyítést követően a korai embrionális fejlődés is megtörténhet. Manapság a technikát legtöbbször ovarialis stimuláció mellett alkalmazzák, így általában egyszerre több tüsző érik és transzvaginális ultrahang által vezérelve több oocita is leszívásra kerül a minél magasabb hatékonyság érdekében. Az ekképpen izolált oocita/oociták közelébe helyezhetőek az előkészített, motilis spermiumok, melyet követően a fertilizáció további fázisai a természetes útnak megfelelően zajlanak le. A folyamat mindeközben az

inkubátorban szorosan követhető, majd az embrió fejlődésének korai fázisában az uterus ürterébe visszahelyezhető, ahol az implantáció így megtörténhet.

A módszer általában jól alkalmazható tubáris eredetű meddőség, csökkent ovariális rezerv, ovulációs diszfunkció, donor petesejt felhasználása, rekurrens vetélés, preimplantációs genetikai igénye, ismeretlen eredetű női meddőség és korábban sikertelen IUI esetén, azonban súlyos fokú férfi eredetű meddőség esetén hatásfoka általában alacsony.

Fontos megjegyezni, hogy az in vitro fertilizáció fogalma kettős jelentésű: nemcsak a fentiekben leírt technikát, hanem tágabb értelemben az asszisztált reprodukció teljes folyamatát is jelölheti, bármely technikával is történjen maga a megtermékenyítés.

### 1.4.3. Intracitoplazmatikus spermium injekció (ICSI)

Az ICSI 1992-ben [33] történt bevezetése forradalmat hozott az meddőség kezelésében: a módszer által súlyos fokú férfi eredetű meddőség (pl. NOA miatt TESE során nyert tesztikuláris spermium felhasználása) esetén is sikeres megtermékenyítés vált elérhetővé, míg korábban ez a rendelkezésre álló technikák (még IVF) segítségével is megvalósíthatatlan volt. Jelenleg világszerte asszisztált reprodukciós kezelésekből kb. 70%-ában ezt a módszert választják. Az ovariális stimuláció és a petesejtek leszívása a korábbiakban ismertetteknek megfelelően zajlik. Az ICSI jelenti a legnagyobb kontrollt a fertilizációs folyamat felett: egyetlen kiválasztott spermium kerül injektálásra mikroszkóp alatt, mikropipetta segítségével a petesejt citoplazmájába, ezzel az akroszóma reakció általi cumulus-corona radiata komplexen való áthatolás és a zona pellucida interakció a folyamatból kikapcsolásra kerül. Valószínűleg természetes szelekciós mechanizmusok kikerülésének tudható be, hogy az ICSI útján fogantatott gyermekek esetében magasabb az imprinting zavarok, nemi kromoszómák eltéréseinek, illetve epigenetikai elváltozások megjelenése [34,35].

A technika fő indikációit a súlyos férfi eredetű meddőség esetei jelentik: súlyos OAT, abszolút astenozoospermia, azoospermia miatt sebészileg nyert tesztikuláris vagy krioprezervált spermium felhasználása, spermium ellenes antitestek jelenléte, magas DNS fragmentációs index (DFI), globozoospermia (hiányzó akroszóma) [36].

Mintegy trendként jelenik meg az ICSI alkalmazása bizonyos nem férfi eredetű faktorok esetén is [37], bár a módszer előnyét az IVF-val szemben a legtöbb esetben eddig erős bizonyítékok nem támasztják alá. Ilyen indikáció lehet korábbi sikertelen IVF, előrehaladott anyai kor, ismeretlen eredetű meddőség, csökkent ovariális rezerv, policisztás ovárium szindróma (PCOS), endometriózis vagy preimplantációs genetikai vizsgálat igénye [36].

Paffoni és mtsai. által 2024-ben az Egyesült Királyság reprodukciós hatósági szervei által 2005 és 2018 között gyűjtött adatok alapján végzett retrospektív analízise [37] szerint csak női faktor jelenléte mellett végzett ICSI esetén az élve születési ráta (*live birth rate, LBR*) csökkenése volt látható, illetve ismeretlen eredetű meddőség esetében nem észleltek szignifikáns előnyt ICSI esetén az IVF-val szemben. Yang és mtsai. által 2024-ben közzétett, 18 randomizált-kontrollált vizsgálatot (*randomized controlled trial, RCT*) feldolgozó metaanalízisének [38] eredményei szerint bár az ICSI növelte a fertilizációs rátát (*fertilisation rate, FR*) és csökkentette a teljes fertilizációs kudarc (*total fertilisation failure, TFF*) esélyét, a klinikai mutatók (LBR) tekintetében szignifikáns előnyt nem jelentett az IVF-val szemben nem férfi faktor indikáció esetén. A kérdés tisztázására további nagy esetszámú RCT-k szükségesek a későbbiekben, különös tekintettel az ICSI biztonságosságára irányuló aggodalmak fényében.

## 1.5. 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 [39,40] 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 mindezidáig egyik sem bizonyult hatékonyabbnak a többinél a klinikai eredmények (főként az LBR) vonatkozásában [41,42].

### 1.5.1. Konvencionális technikák

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.

A SU teszt az egészséges spermiumok migrációján alapul. Az eljárás során az elfolyósodott ondó mintát egy 45°-os szögbe állított kémcsőbe helyezik, felszínére egy külön réteg tenyésztő

médiomot pipettáznak. Kb. 1-1,5 óra inkubációt követően (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) a motilis, magasabb DNS integritást nagyobb valószínűséggel mutató spermium szubpopuláció a felső frakcióból kinyerhető, míg az alacsonyabb fertilizációs potenciállal rendelkező immotilis, elhalt sejtek, egyéb szennyező sejtek, illetve sejtörmelék az alsó frakcióban maradnak. A módszer hátránya a kinyerhető alacsony sejtszám (kb. 5-10%), így ez főként csak normozoospermias minták esetében alkalmazható.

A DGC során általában szilikát alapú kolloid oldatot felhasználva fentről lefelé haladva folyamatosan/szakaszosan (elkülönülő folyadékrétegek) növekvő sűrűségű grádiens hoznak létre, majd az elfolyósodott ondómintát ennek a tetejére rétegzik. Centrifugálás során az egészséges spermiumok nagyobb fajlagos sűrűségüknél, illetve jó motilitásuknál fogva gyorsabban vándorolnak lefelé, így a művelet végeztével azok a pelletben fellelhetők. A sűrűség grádiens centrifugálással nagyobb számú sejt nyerhető ki, mint a felúszási teszt során, azonban a módszer hátránya lehet a centrifugálási lépés során képződő reaktív oxigéngyökök (ROS) által kifejtett oxidatív stressz, mely a spermiumokban DNS-fragmentációt és lipidperoxidációt vált ki. Ennek a veszélye csökkenthető a lehető legalacsonyabb centrifugális erő alkalmazásával (általában 300×g, 20 perc) [43–45]. Speciális esetekben (pl. súlyos oligozoospermia, cryptozoospermia, magas viszkozitás) ezen konvencionális spermium szelektációs módszerek sajnos nem hatékonyak, ilyenkor alkalmazhatók az ún. fejlett spermium szelektációs eljárások.

### 1.5.2. Fejlett technikák

A módszer neve	Működésének alapja, elve
Zéta potenciál	Az érett spermium sejtmembránjának két oldala között fenntartott töltéskülönbség mérése
Motilis spermiumok organelumainak morfológiai vizsgálata (MSOME)→intracitoplazmatikus morfológiailag szelektált spermium injekció (IMSI)	Hat organelum (akroszóma, poszt-akroszómális lamina, nukleusz, nyak, fark, mitokondriumok) morfológiai analízise
Hialuronsav kötődési vizsgálat (HBA), fiziológias intracitoplazmatikus spermium injekció (PICSI)	Hialuronsav kötő glikoproteinek megléte az érett spermium sejtmembránjának külső felszínén
Mágneses sejt szeparálás (MACS)	Apoptotikus spermiumok membránjában lévő foszfatidil-szerin (PS)-annexin V kötődése
Mikrofluidikai eljárások	Érett, motilis spermium aktív mozgása lamináris áramlás ellenében



A módszer neve	Működésének alapja, elve
Hipo-ozmotikus duzzadási teszt (HOST)	Hipo-ozmotikus környezetben megtartott membrán integritás esetén a sejt duzzad, ezáltal a spermium farki része feltekeredik
Lézer-asszisztált immotilis spermium szelekció (LAISS)	Rövid, alacsony energiájú lézer impulzus leadása a spermium farki részére célozva egészséges spermium esetén a farki rész feltekeredését indukálja
Polarizációs mikroszkópia	Az egészséges, normál morfológiájú spermium feji része természetes kettős fénytörést mutat

3. táblázat: *Fejlett spermium szelekciós technikák összefoglalása* [46]

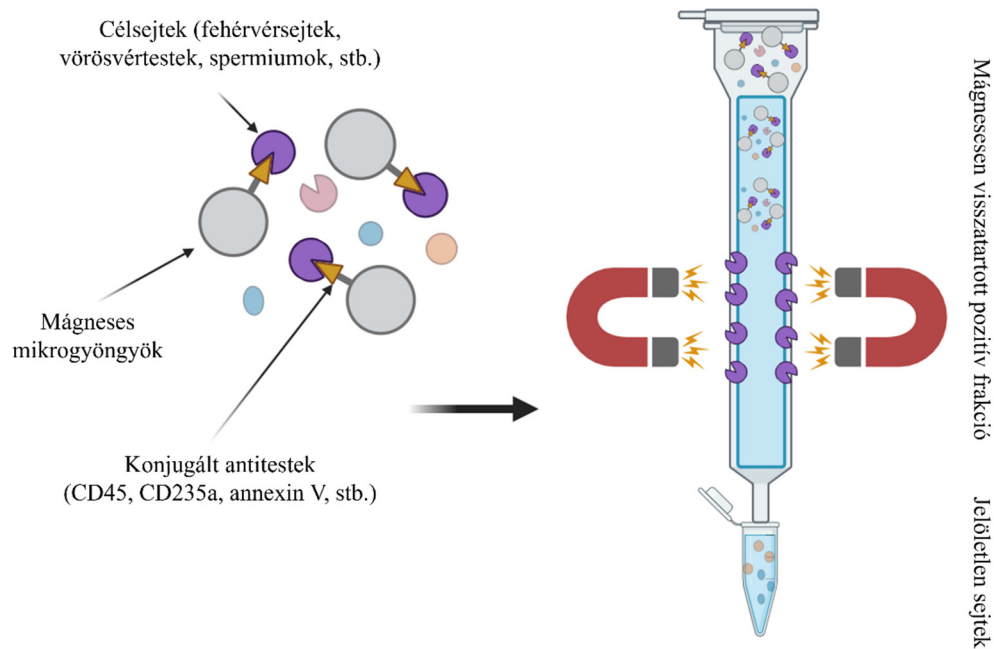
A fenti táblázatban felsorolt, összes módszer működésének részletezése meghaladja jelen írás kereteit. Tekintettel az értekezés témájára, a következőkben a MACS technika alapjai kerülnek kifejtésre.

### 1.5.2.1. Mágneses sejt szeparálás (MACS)

Az eljárás alapjait 1995-ben Pesce és De Felice fektette le, kísérleteikben egér embriókból származó primordiális őssejtek szomatikus sejtektől való elkülönítésére alkalmazták [47]. Azóta az immunológiai, onkológiai, idegtudományi, mikrobiológiai, illetve őssejt kutatás egyik fontos eszközévé vált [48–55]. Különbőféle 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. Létezik jelölésmentes módszer is, mely olyan sejtek esetében használható, melyek természetesen paramágneses anyagokat (pl. hem a vörösvértestekben) tartalmaznak, ezáltal mágneses térbe kerülve önmagukban is migrációt, ún. *magnetoforézist* mutatnak. Shamloo és mtsai. kidolgoztak egy kétlépcsős mikrofluid készüléket, mely részben ezt a jelenséget felhasználva képes a véráramban cirkuláló tumorsejtek szeparálására a vörösvértestektől, vérlemezkéktől, ill. fehérvérsejtektől [56]. 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.) [57], a legkézenfekvőbbnek az összes, nem kívánt sejt kisselektálása 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 [58]. 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-szerin (*phosphatidyl-serin(PS)*) externalizációja [59]. 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 [60]. Egy Hichri és mtsai. által közzétett tanulmányban [61] a spermium különféle apoptotikus változásai (aktivált kaszpázok aránya, externalizált PS, fragmentált DNS) az ART-k kimenetelének független prediktorának bizonyultak a klasszikus paramétereiktől függetlenül. Közülük a DNS-fragmentáció mutatta a legjobb prediktív értéket [61]. Az eredeti módszer a PS annexin V nevű fehérjéhez való nagy affinitású kötődésén alapul. Az annexin V molekulákat mágneses mikrogöngyök felszínéhez konjugáljuk, majd ezekkel a mikrogöngyökkel 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*) (2. ábra) [62].



2. ábra: MACS működésének alapelve [63]

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 izolálhatók [64–73]. Esbert és mtsai. 2017-ben kimutatták, hogy a szelektált populációban alacsonyabb a különféle számbeli kromoszómális eltérések (21 kr. aneuploidia, összes aneuploidia (13, 18, 21, X, Y kr.), összes kr. anomália (aneuploidia+diploidia)) jelenléte, mint az oszlopon maradt sejtekben [74].

Mindezek ellenére, a technika ART-k kimenetelére gyakorolt valós, pozitív klinikai hatása egyelőre nagy esetszámú RCT-okban nem került bizonyításra, így a jelenlegi európai asszisztált reprodukciós irányelvek (*European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)*) alkalmazását egyelőre nem ajánlják [75]. Az elérhető kutatások a MACS-ot általában nem önállóan, hanem más, egyszerűbb spermium szelekciós technikákkal (SU, DGC) kombinálva vizsgálják. Lepine és mtsai. által 2019-ben publikált Cochrane összefoglaló közlemény [76] szerint egyértelmű bizonyíték nem áll rendelkezésre a módszer klinikai terhességi arányt, élve születési rátát emelő, illetve a vetelési arányt csökkentő hatására. Mei és mtsai. 2022-ben a MACS-ot a klasszikus spermium szelekciós eljárásokkal (SU+DGC) együtt vizsgálták 86 IVF-n/ICSI-n áteső páciens esetében, akiknek a klinikai, illetve embriológiai paraméterei jelentős különbséget nem mutattak. Az első embrió transzfert követően

szignifikáns különbséget a klinikai terhességi, illetve implantációs rátában nem találtak, azonban az első ciklusra vetített, illetve kumulatív LBR jelentősen javult alacsonyabb beültetett embrió szám, illetve ciklus mellett [77].

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 [60].

## 1.6. Abszolút asthenozoospermia

Fiziológiásan a spermiumok érése a mellékhere csatornáiban történő tranzitjuk során zajlik. Ezalatt számos biokémiai átalakulás történik: módosul a spermiumok proteomja (poszttranszlációs módosulások, illetve exogén proteinek akvizíciója), membránlipid összetétele (pl. nő a többszörösen telítetlen zsírsavak aránya), sejtfelszíni glikán mintázata, illetve jelátviteli útvonalak aktiválódnak. Mindezek eredményeként a spermium alkalmassá válik a későbbi kapacitáció lezajlására, illetve szert tesz progresszív motilitási képességére [78]. 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 [79].

Az abszolút asthenozoospermia egy ritka rendellenesség (előfordulás: 1/5000 férfi) a motilitás teljes hiányát jelenti a friss ejakulátumban. Háttérben 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 önmegtartóztatás következtében) okok is felmerülnek, de számos esetben idiopátiás jelenségről beszélünk [80,81]. 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 [82].

Míg spermiumok *vitalitása* az intakt sejtmembránjuk alapján indirekten mért élő spermium arányt jelenti, addig a *viabilitás* egy jóval szofisztikáltabb, a funkcionális integritást is figyelembe vevő fogalom [83], 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 necrozoospermias mintától differenciálható, azonban az így vizualizált életképes spermiumok asszisztált reprodukcióhoz már nem felhasználhatók. A vizsgálat a WHO ajánlás szerinti spermaanalízis részét képezi, 40% alatti teljes motilitás esetén végzendő el [17]. 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 [80,84–89]), azonban ezek felhasználása problematikus lehet pontatlanságuk, invazívitásuk, potenciális toxicitásuk miatt. Egyedül a HOST-tel kapcsolatban nem vetődött fel hasonló aggály, mely egyszerű, gyorsan elvégezhető, a spermiumok tekintetében kíméletes eljárásnak mondható, viszont krioprezervált sejtek felhasználása esetében a potenciálisan fellépő spontán duzzadás miatt korlátozottan használható, illetve eredménye nagyban függ a módszert alkalmazó személy szakmai jártasságától [90–92].

## 1.7. 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*”)) [93,94]. A mindennapi klinikai gyakorlatot tekintve, szinte minden vizsgált minta valamilyen mértékben szennyezett fehérvérsejtekkel (főként polimorfonukleáris (PMN) sejtekkel (granulocitákkal, 50-60%)) [95]). A WHO aktuális iránymutatása alapján (*WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed., 2021* [17]) 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 [95].

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) [96,97] következtében is kialakulhat. Korábban veleszületett hátsó húgycső billentyű miatt, annak ablációján átesett felnőtt férfiakban is megfigyeltek leukocitospermiát [98]. A sperma paraméterekben észlelhető elváltozások általában nem specifikusak, és nehezen állíthatók korrelációba a predomináns fehérvérsejt szubpopulációval, azonban néhány speciális patomechanizmus eddig már leírásra került. A PMN sejteket gyulladásos citokinek aktiválják, melyet ROS produkció („oxidative burst”), következményes oxidatív stressz követ [99]. Amennyiben az oxidatív hatások túlsúlyba kerülnek és a szeminális plazma antioxidáns enzimszisztémájának kapacitását meghaladják, lipid peroxidáció, a membrán integritás elvesztése, ezek következményeként mitokondriális, illetve nukleáris DNS sérülése, fragmentációja alakulhat ki [100], 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 [101–104]. A T-limfociták általában sokkal kisebb frakcióját (2-5%) adják az ondóban található fehérvérsejteknek, interferon- $\gamma$  által mediálva negatív hatást fejtenek ki a spermiumok motilitására [105].

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

A hemospermia a vér ondóban való megjelenését jelenti, mely számos patológiás 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 [17,106]. A TESE során nyert hereszövet minta nem csupán a spermatozoát, hanem a spermium előalakokat, illetve más eredetű sejteket (fehérvérsejtek, vörösvértetek, epitel sejtek) is tartalmaz.

Az említett esetekben az asszisztált reprodukcióhoz felhasználni kívánt biológiai mintában található vörösvértestek 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 [107–110]. 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 [111].

## 1.9. Cluster of differentiation

A *Cluster of differentiation* (CD) nevű molekuláris azonosítási rendszer alapjait 1982-ben Párizsban fektették le [112]: 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 [113].

### 1.9.1. 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 [114].

### 1.9.2. 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 [115]. Ezentúl patológiás folyamatokban is szerepet játszik különböző kórokozók, például a maláriát okozó protozoon, a *Plasmodium falciparum* receptoraként viselkedve [116].

## 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, vörösvértetek 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 DFI-e 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 vörösvértetek 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 spermaképű 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×g, 12 min). Ehhez 40%, illetve 80% PureCeption™ (gyártó: Cooper Surgical Inc., Trumbull, Connecticut, USA) oldatokat használtunk, ez kovalensen kötött hidofil szilán molekulák által stabilizált szilikát részecskék steril kolloid szuszpenziója, HEPES oldattal puffereelt 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×g, 4 min). A felülúszót ismét eltávolítottuk, 200 µl MACS ART annexin V reagenst, majd 500 µl 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 [117] szerint. A DFI-et a TUNEL-pozitív sejtek számát a teljes sejtszámmal elosztva számoltuk ki.

Az abszolút asthenozoospermias minta esetében a vitalitás meghatározását eosin festéssel végeztük, a DNS-fragmentáció vizsgálata SCD módszer [118] szerint történt a gyártó utasításai és a WHO ajánlásai szerint, egyebekben a mintagyűjtés és alapvizsgálatok a fentiekben részletezetteknek megfelelően zajlottak. A vitalitás meghatározásához 5 µl ondómintához ugyanennyi 1% eosin-Y oldatot kevertünk, tárgylemezen kenetet húztunk belőle, fedőlemezzel fedtük, 30 sec-ig 37°C-on inkubáltuk, majd 200 spermatozoon-t értékeltünk. Az SCD teszt során az ondómintát PBS-sel hígítottuk 5-10 millió/ml koncentrációig, 30 µl mintát 1% agarózzal kevertünk össze 37°C-on, majd ebből 14 µl-t egy előkészített, agarózzal borított tárgylemezre pipettáztunk, fedőlemezzel fedtük. Ezt 5 percig 4°C-on inkubáltuk, majd a fedőlemezt eltávolítva a tárgylemezt 7 percig denaturációs oldatba (0.08 M HCl), majd 25 percig egy lizis 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 kitékint a Microptic S.L.-től vásároltuk. A sűrűség gradiens centrifugáláshoz használt PureCeption™ és spermium tápoldatokat az Origio gyártotta (CooperSurgical, Trumbull, Connecticut, USA).

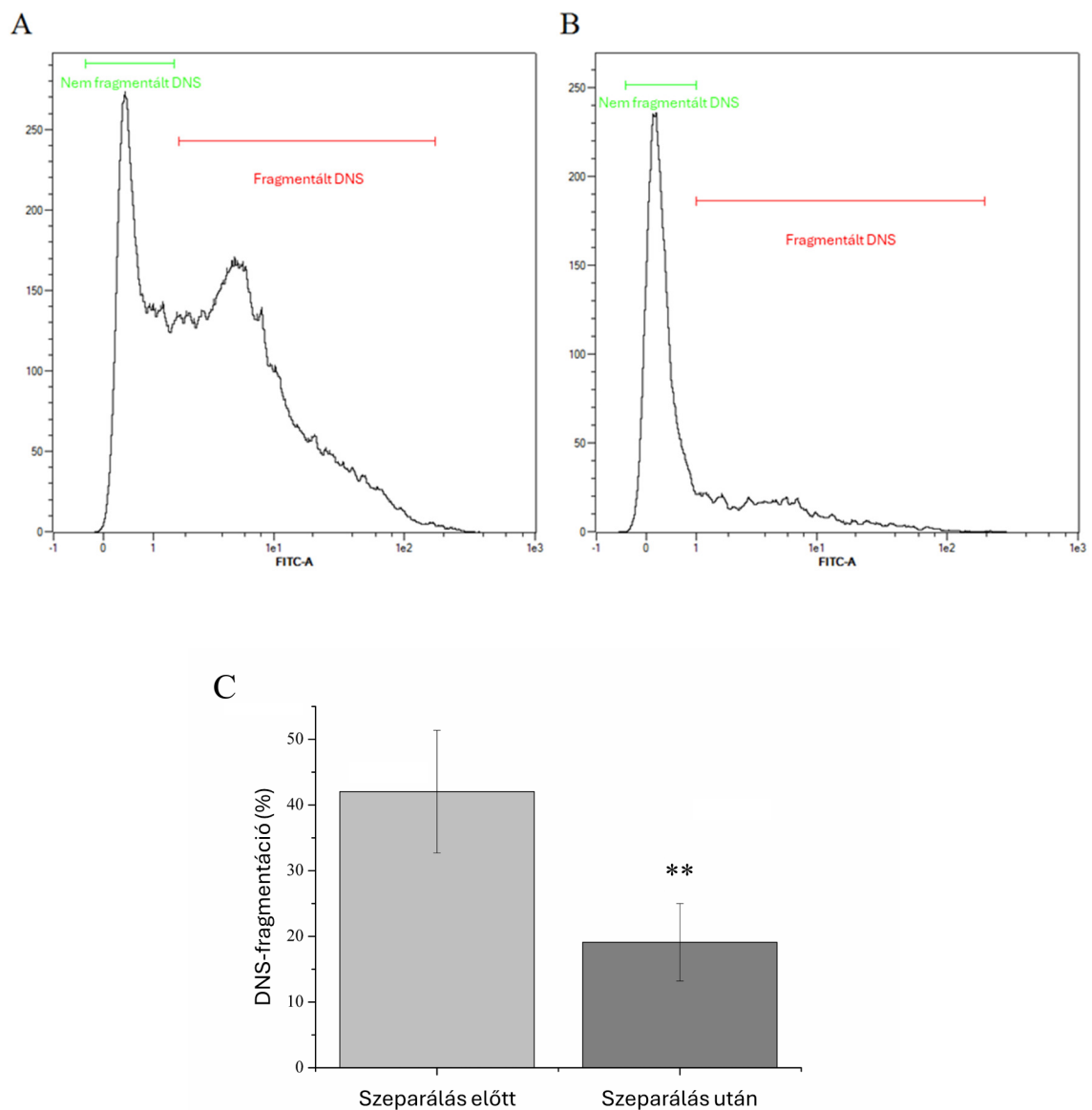
### 3.6. Statisztikai analízis

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 tesztel, kétmintás t-próbával, a nem normál eloszlást mutató változókat Kruskal-Wallis non-parametrikus tesztel 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 ( $p < 0,01$ ; 3. ábra).



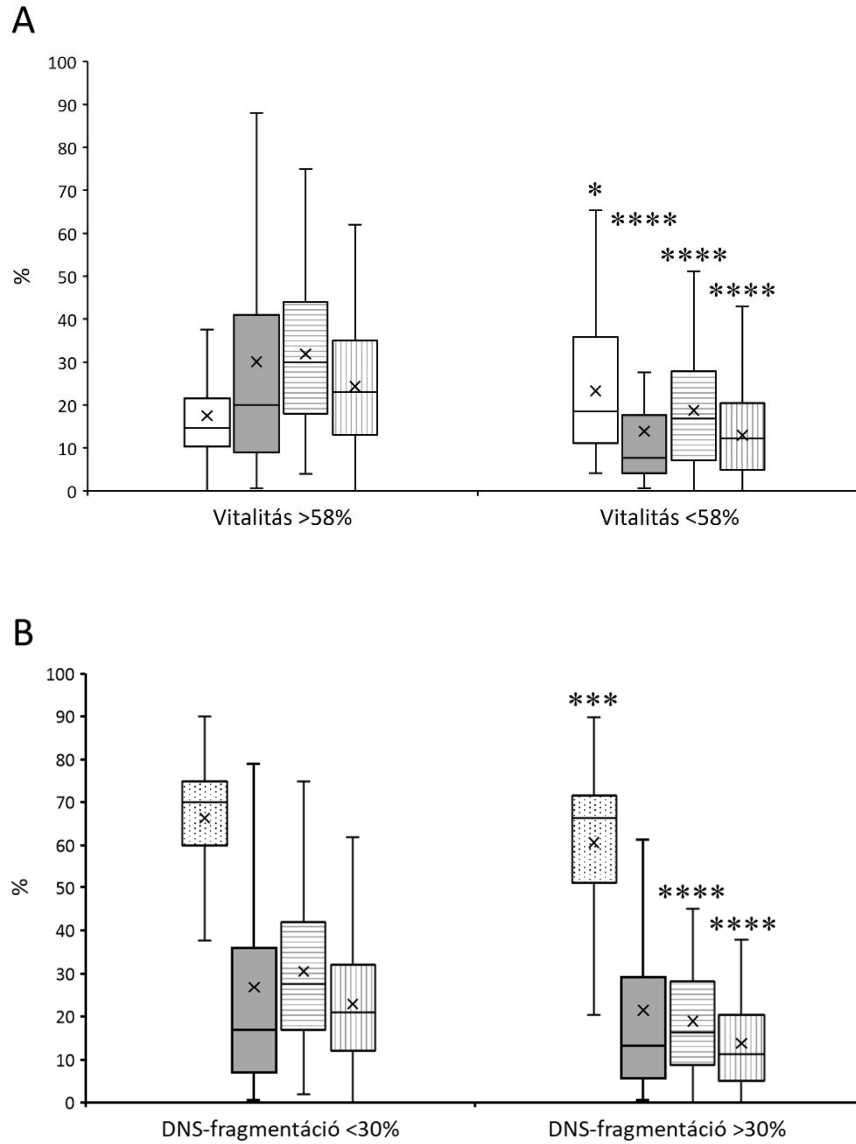
3. ábra: Az annexin V jelölés alapú mágneses szeparálás hatása a spermiumok DNS-fragmentációjára. DNS-fragmentáció a TUNEL assay-vel végzett mérés alapján a szeparálás előtt (A) és után (B). DFI szeparálás előtt és után (C).  $**p < 0,01$ ; kétmintás t-próba.

## 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.  $12,67 \pm 9,95\%$  (4/A. ábra).

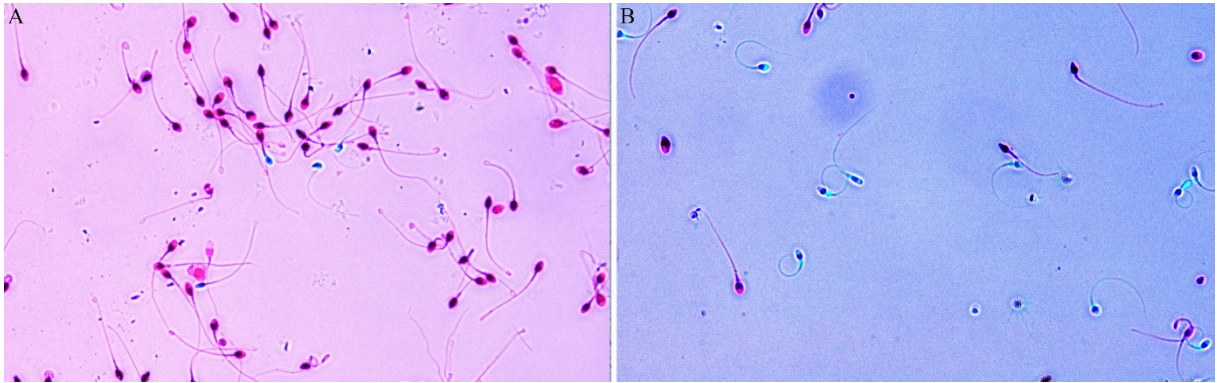
A DFI irányából megközelítve még jelentősebb különbségek látszottak ( $p<0,001$ ): az alacsony DFI-t mutató csoportban a vitalitás  $66,91 \pm 14,08\%$  volt, míg ez a magas DFI-ű csoportban  $56,25 \pm 16,44\%$ -nak adódott. A koncentráció, a motilitás, illetve a progresszív motilitás a következőképpen 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.  $12,68 \pm 9,68\%$  (4/B. ábra).



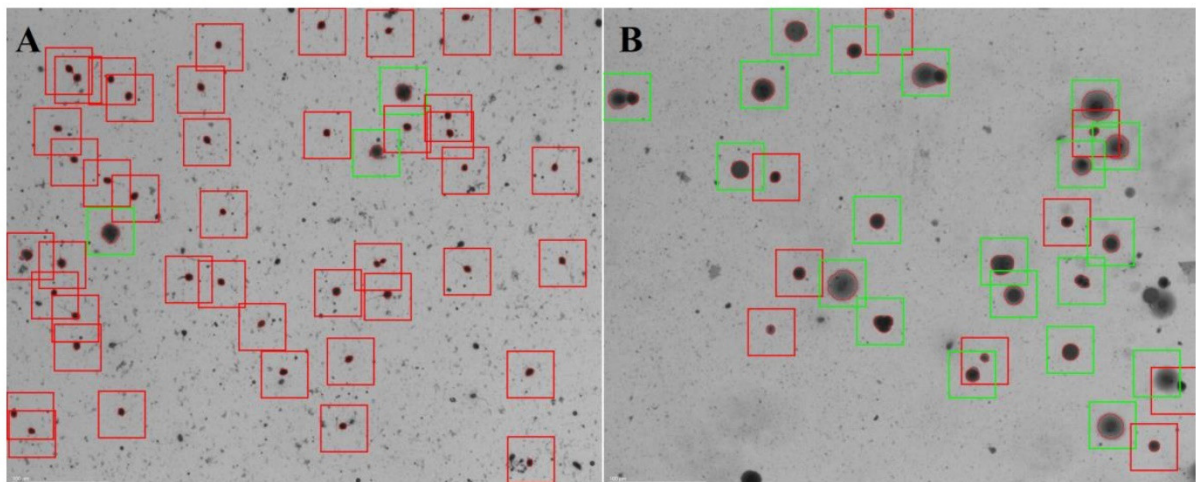
4. ábra: A spermiumok vitalitásának és a DNS-fragmentáció korrelációja. (A) DNS-fragmentáció (fehér oszlop), spermium koncentráció (szürke oszlop), motilitás (vízszintesen vonalazott oszlop), progresszív motilitás (függőlegesen vonalazott oszlop) normális vitalitás vs. necrozoospermia esetén. (B) Vitalitás (pontozott oszlop), spermium koncentráció (szürke oszlop), motilitás (vízszintesen vonalazott oszlop), progresszív motilitás (függőlegesen vonalazott oszlop) alacsony vs. magas DNS-fragmentáció esetén. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; 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 (5. ábra), míg a DFI 28,2%-ra csökkent (6. ábra)



5. ábra: Spermiumok vitalitása a mágneses szeparálás előtt (A) és után (B). A sejteket eosin festékkel jelöltük. Az élő spermiumok színtelenek, míg a halott sejtek vörösén festődnek.

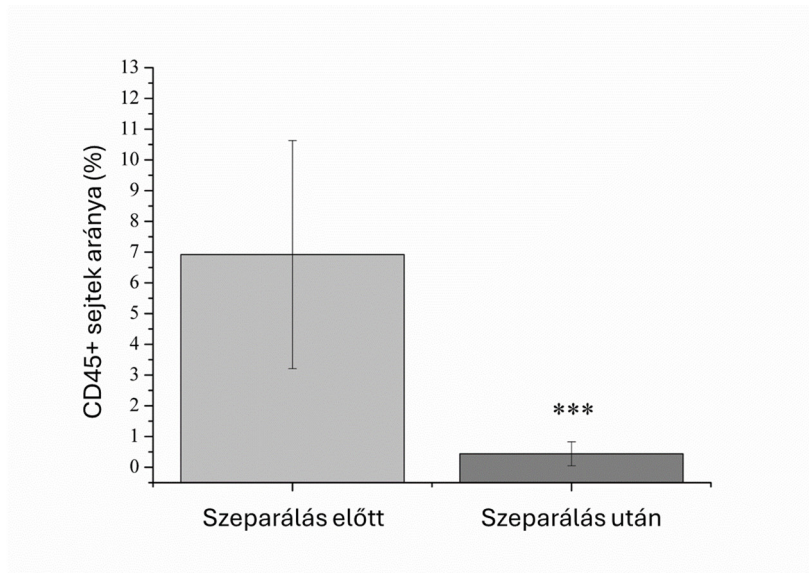


6. ábra: DNS-fragmentáció mértéke a mágneses szeparálás előtt (A) és után (B). A sejteket az SCD módszer szerint jelöltük. Az egészséges sejtek feji része körül kiterjedt „halo” jelenség figyelhető meg (zöld négyzetekben), míg a fragmentált DNS-sel bíró sejtek körül minimális vagy egyáltalán nincs (piros négyzet).



#### 4.4. Fehérvérsejtek mágneses szeparációja

Leukocitospermia 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 ( $p < 0,001$ ; 7. ábra).

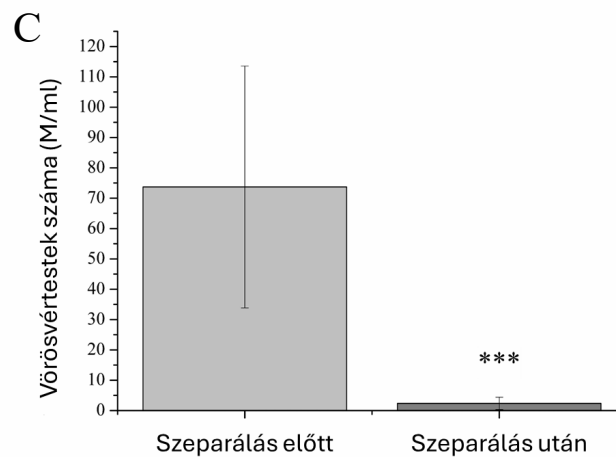
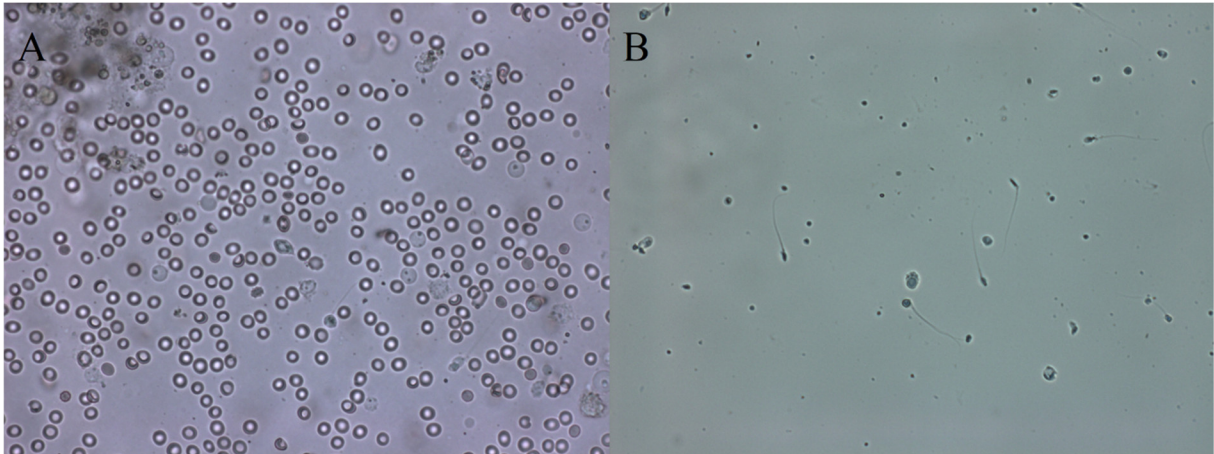


7. ábra: CD45+ sejtek aránya a mágneses szeparáció előtt és után.

\*\*\* $p < 0,001$ ; 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 ( $p < 0,001$ ; 8. ábra).



8. 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.

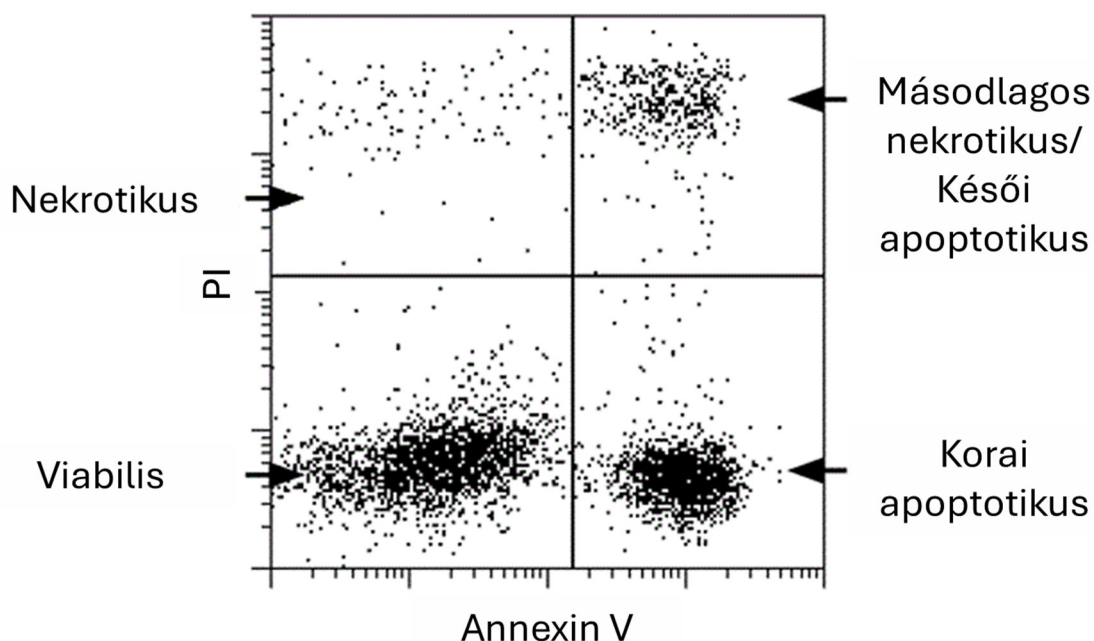
## 5. Megbeszélés és következtetések

---

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. A szigorúan kontrollált folyamat során a sejt citoplazmájából semmi sem kerül szabadon az extracelluláris térbe, ezáltal gyulladás sem indukálódik. Ezzel szembe állítható a *nekrózis*, mely minden esetben patológias folyamat. Ennek során a sejt duzzad, a sejttag és az intracelluláris organelumok szétesnek, végül a sejtmembrán integritása megszűnik és a citoplazma passzív, kontrollálatlan módon áramlik ki a sejtből, mely negatív hatásokat (gyulladás) fejt ki a környező sejtekre és akár a szervezet távolabbi pontjain is. Az apoptózis fontos funkciókat tölt be a homeosztázisban: szerepet játszik például az egyedfejlődésben, a szövetek állandó volumenének fenntartásában (sejtproliferáció/-pusztulás egyensúlya, az ún. *turnover*), hormon dependens szöveti atrofiaiban (pl. endometrium leökődése a menstruáció során), az immunrendszer működésében (pl. autoantigéneket felismerő immunsejtek eliminációja) és az öregedés fiziológias folyamataiban. Regulációjának felborulása, az ennek következtében csökkent/fokozott apoptózis szerepet játszik bizonyos patológias folyamatokban is (csökkent: tumorgenezis, vírusfertőzések, stb.; fokozott: AIDS, szív-/agyi infarktus, neurodegeneratív kórképek (pl. Alzheimer-kór), stb.). Az apoptotikus szignál hatáshelyétől függően a folyamat

két főbb, a receptoriális vagy *extrinszik* és a mitokondriális vagy *intrinszik* útvonalon indukálódhat. Emellett létezik egy további, citotoxikus T-sejtek által indukált, perforin-granzim mediált mechanizmus is. Az extrinszik útvonalat transzmembrán receptorok és ligandjaik kapcsolódása aktiválja, ezek közül a legfontosabbak a TNF $\alpha$ /TNFR1 és a FasL/Fas. A ligand kötődését követően a receptor aktivációja, majd trimerizációja zajlik, adapter fehérjék kötődnek az így kialakult komplexhez, végül a prokaspáz-8 kötődése, aktivációja vezet a prokaspáz-3 enzim proteolitikus aktivációjához, mely által elindul az apoptózis végrehajtási fázisa („*execution pathway*”). Az intrinszik útvonalat olyan intracellulárisan ható stimulusok indítják be, melyek általában a sejt számára valamiféle stresszt jelentenek: növekedési faktorok depléciója, hipoxia, oxidatív stressz, irradiációs hatás, toxin, hipertermia, virális infekció, stb. Mindezen hatások végső sorban a mitokondriális membrán potenciáljának változásához, megszűnéséhez járulnak hozzá, melyet a p53 tumorszuppresszor fehérje által regulált Bcl-2 család kontrollál. A Bcl fehérjék pórusokat képeznek a mitokondrium külső membránján. Ennek eredményeként az intermembrán térben elhelyezkedő proapoptotikus fehérjék (citokróm c, Smac/DIABLO, AIF, stb.) a citoszólba vándorolnak. A citokróm c a Apaf-1-hez és a prokaspáz-9-hez kötődve létrehozza az ún. *apoptosómát*. Az így aktiválódott kaszpáz-9 aktiválja a prokaspáz-3-at, innentől becsatlakozva a fentebb említett végrehajtási útvonalba. A végrehajtó kaszpázok számos további enzim proteolitikus aktivációját idézik elő (pl. proteázok, endonukleázok), hasítják a citoskeleton molekuláit és a nukleoproteineket, mely hatások összességében végül a fent részletezett morfológiai változásokhoz vezetnek. A folyamat utolsó fázisában a kialakuló apoptotikus testek fagocitózisa történik a környező sejtek, főként makrofágok által. Ennek kulcsmomentuma a PS externalizációja, mely egyfajta non-inflammatorikus fagocitózis szignálként funkcionál, szerepe esszenciális az apoptózis maradéktalan lejátszódásában [119,120]. Fontos megjegyezni, hogy nekrozis esetében a sejtmembrán integritás megszűnése eredményeként a PS annak belső felszínén is hozzáférhetővé válhat (9. ábra).



9. ábra: A spermium sejtek annexin V pozitívításának sematikus ábrázolása. A non-viabilis sejtek propidium-jodiddal (PI) jelölhetők, de néhány esetben ezen sejtek annexin V pozitívítást is mutathatnak.

Az apoptózis fontos élettani funkciókat tölt be a spermatogenezis során: szerepet játszik az optimális Sertoli-sejt-csírarsejt arány megőrzésében, illetve a defektív fejlődést mutató előalakok eltávolításában. Ezzel szemben különféle kóros behatások (pl. oxidatív stressz) esetén is felléphet apoptózis, ilyenkor általában fokozott, szabályozatlan módon, mely a férfi meddőség kialakulásában is szerepet játszhat [121]. Bizonyított, hogy a Sertoli-sejtek az apoptózis receptoriális útján keresztül szabályozzák a csírarsejtek számát a germinális hámban. FasL-ot expresszálnak, mely parakrin jelként kapcsolódik a környező Fas-t expresszáló, abnormális csírarsejtekhez, azok apoptózisát indukálva [122,123]. Azonban a Fas-t hordozó spermiumok közül néhány kikerüli a fenti mechanizmust, így ezek akár az ejakulátumban is megjelenhetnek, ilyenkor ún. *abortív apoptózisról* beszélünk [124,125], habár úgy tűnik, ez a jelenség csak az éretlen spermiumok jellemzője, az érett spermiumokban a teljes apoptotikus folyamat képes lejátszódni a receptoriális út indukciója által [126]. Az érett és éretlen spermiumok, illetve az egyes spermium előalakok között is finom különbségek jelentkezhetnek az expresszált apoptotikus markerekben. Cayli és mtsai. magasabb Bcl-XL és kaszpáz-3 szinteket mutattak ki éretlen spermiumok esetén, előbbi antiapoptotikus fehérjeként szerepet játszhat ezen sejtek abortív apoptózisában [127]. Joshi és Dighe 2006-os publikációjukban tesztoszteron depléción mellett vizsgálták kerek spermatidák és spermatociták expressziós

mintázatát apoptotikus gének esetében: a kerek spermaticidák esetén magasabb kaszpáz-1, -2 szintek látszóttak, míg a spermaticidák esetében a Bax, illetve a Fadd protein mutatott intenzívebb kifejeződést [128]. A tesztikuláris és az ejakulátumban található spermiumok vonatkozásában apoptotikus marker mintázatbeli különbségre szakirodalmi adatot nem találtam. Az apoptotikus jeleket (aktivált kaszpázok, externalizált PS, DNS fragmentáció) mutató spermiumok aránya az ejakulátumban magasabb a meddő férfiak körében [61,129]; hogy ezek még a herében/ondóutakban vagy már az ejakulációt követően jelennek meg, egyelőre kérdéses. 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 [71,126,130–132].

A MACS spermiumok DNS fragmentációját csökkentő hatását már korábban is számos tanulmányban igazolták [64–66,68–73]. Vizsgálataink kiindulásaként ezt ellenőriztük: a minták annexin V-alapú szeparálásával a DFI szignifikáns mértékű,  $2,19\times$  csökkenése volt elérhető (3. 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 nekrosis 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 [92]. 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 [133]. Brahem és mtsai. vitalitás dependens változásokat észleltek a DFI alakulásában normo-, illetve különböző fokú necrozoospermiát mutató minták vizsgálata kapcsán: minél magasabb a vitalitás, annál alacsonyabb értékű DNS fragmentáció mérhető [134]. Emellett, Samplaski és mtsai. az általuk prospektív módon vizsgált 3049 minta esetében 75%-nál magasabb vitalitás esetén az esetek 95%-ában 30% alatti DFI-t találtak, ezzel igazolva a spermiumok viabilitása és DNS fragmentációja közti szoros korrelációt [135]. Az eddig fellelhető eredményekkel összhangban, vizsgálatunk során negatív korrelációt találtunk a spermiumok vitalitása és a DNS

fragmentációjuk mértéke között (4. 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 elhalttól, ezáltal nagyméretékben nő a vitalitás, és a fentiek szerint, csökken a DNS-fragmentáció [136–139]. Ezt jelenséget hasznosítják a mikrofluidikai szeparációs chippek (pl. ZyMōt™), melyek csökkentik a DFI-t, növelik a motilitást, és ezek által a vitalitást is [140]. Sajnálatos módon ezen eljárások nem működőképesek döntő részben immotilis spermium populáció esetén. Egy másik tanulmány [141] a progresszív motilitás változását írta le a DFI függvényében; érdekes módon ezen vizsgálatban vitalitással való korrelációt nem találtak. 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 IUI/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 [136–139]. 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 [142]. A MACS az eddigi tanulmányok alapján biztonságos módszernek mondható [143], 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 (5. ábra). 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 összhangban, jelentős csökkenést tudunk kimutatni a minta DFI-ében (77,6% vs. 28,2%; 6. ábra). Martínez és mtsai. [73] által közölt adatok alapján a MACS ezen hatása nem homogén módon jelenik meg a betegpopulációban: főként a magas DFI-t mutató minták (DFI>30%) esetében kifejezett, akár 2-3×-os összehasonlítva az alacsony DFI-t (<30%) mutató mintákkal. Utóbbi esetekben a negatív frakció fragmentációs értéke akár nőhet is a kiindulásihoz képest. Ezentúl pedig markáns össz-DFI csökkenés esetén is maradhat fragmentált DNS-t tartalmazó spermium a negatív frakcióban; a jelenség feltehetően az apoptotikus markerek expressziójának egyedi, finom különbségei miatt jelenhet meg. 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 leukocitospermias ejakulátumot szennyező fehérvérsejtek eltávolítására, melyek káros hatásokat fejtenek ki a fertilitásra: Fraczek és mtsai. 2016-os tanulmányukban izolált leukocitospermias ondó mintákat vizsgálva csökkent spermium koncentrációt, teljes és progresszív motilitást, illetve emelkedett malondialdehid (MDA) szinteket észleltek a kontrollokhoz képest, mely utóbbi a lipidperoxidáció egyik biokémiai markere [102]. 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 organellek membránjának fluiditása. Ez alapvetően károsítja a spermium olyan kardinális funkcióit, mint a kapacitáció, az akroszóma reakció, a spermium-ocita 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 [94]. 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 [144–146]. Mindezek alapján nyilvánvaló, hogy a felhasználni kívánt ejakulátumot szennyező fehérvérsejtek eliminációja előnyös lehet a reprodukciós eljárás eredménye szempontjából. Néhány tanulmányban már vizsgálták ennek lehetőségét MACS alkalmazásával [147–149]. Ochsendorf és mtsai. anti-CD67-tel bevont mikrogöngyöket is használtak szelektíven a granulociták eltávolítására, melyek a ROS termelésért elsődlegesen felelős fehérvérsejt szubpopuláció. Maietta és mtsai. CD45 mágneses mikrogöngyöket alkalmaztak ondómintából fehérvérsejtek izolálására, azok szubpopulációinak elemzéséhez. Vizsgálatunkban a CD45 alapú szeparáció által a leukociták százalékos arányának szignifikáns,  $15,73\times$  csökkenése volt elérhető leukocitospermiás ondómintákban (7. 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 [108,111]. Ezen gyökök forrása legfőbbképp a hem molekulában jelenlévő nagy mennyiségű vas ion, mely átmeneti fém lévén telítetlen  $d$  elektronhéjának következtében igen reakcióképes, kétféle oxidatív állapotban is létezik. A porfirin gyűrűbe zárt  $\text{Fe}^{2+}$  képes reakcióba lépni hidrogén-peroxiddal, ekkor a Fenton-reakciót ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$ ) katalizálva  $\text{Fe}^{3+}$  ionná alakul. Az így képződő hidroxil gyök ( $\text{OH}^\bullet$ ) az egyik leginstabilabb gyök, könnyedén reakcióba lép a spermium membránjának telítetlen zsírsavaival, a már említett lipid peroxidációt előidézve [150,151]. Ezentúl kimutatták, hogy maga az eritrocita-lízis puffer is toxikus lehet a spermiumok számára: egyrészt a vörösvértetek 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 [108]. Az általunk használt CD235a alapú mágneses szeparálás során a TESE során nyert hereszövet mintákat szennyező vörösvértestek nagyfokú ( $30,8\times$ ), sikeres kivonása vált lehetővé (8. 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 képalkotás (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. 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 sejtfelszíni marker alapján [152]. Elképzelhető, hogy hasonló elven a magas fertilizációs potenciállal bíró spermiumok és a szennyező sejtek szeparációja akár együlésben is elvégezhetővé válhatna.

## 6. Összegzés

---

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. Oxidation-Reduction 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 laparoszkópos 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 microsectio 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. Irodalomjegyzék

---

1. Cox, C.M.; Thoma, M.E.; Tchangalova, N.; Mburu, G.; Bornstein, M.J.; Johnson, C.L.; Kiarie, J. Infertility Prevalence and the Methods of Estimation from 1990 to 2021: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum. Reprod. open* 2022, 2022, hoac051, doi:10.1093/hropen/hoac051.
2. Luo, X.; Yin, C.; Shi, Y.; Du, C.; Pan, X. Global Trends in Semen Quality of Young Men: A Systematic Review and Regression Analysis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2023, 40, 1807–1816, doi:10.1007/s10815-023-02859-z.
3. Pakmanesh, H.; Nazarirobati, N.; Dabiri, S.; Mirshekari, T.R.; Momeni, H.; Jadidi, S.; Rouiantan, H.; Hanafi Bojd, H.; Torabinaid, P.; Narouie, B. Downward Trend in Male Reproductive Health and Fertility in Eastern Iran. *Urologia* 2024, 3915603241261144, doi:10.1177/03915603241261144.
4. Garcia-Grau, E.; Lleberia, J.; Costa, L.; Guitart, M.; Yeste, M.; Benet, J.; Amengual, M.J.; Ribas-Maynou, J. Decline of Sperm Quality over the Last Two Decades in the South of Europe: A Retrospective Study in Infertile Patients. *Biology (Basel)*. 2022, 12, 70.
5. Li, Y.; Lu, T.; Wu, Z.; Wang, Z.; Yu, T.; Wang, H.; Tang, C.; Zhou, Y. Trends in Sperm Quality by Computer-Assisted Sperm Analysis of 49,189 Men during 2015-2021 in a Fertility Center from China. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2023, 14, 1194455, doi:10.3389/fendo.2023.1194455.
6. Levine, H.; Jørgensen, N.; Martino-Andrade, A.; Mendiola, J.; Weksler-Derri, D.; Mindlis, I.; Pinotti, R.; Swan, S.H. Temporal Trends in Sperm Count: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Hum. Reprod. Update* 2017, 23, 646–659, doi:10.1093/humupd/dmx022.
7. Databank, World Development Indicators.  
<https://databank.worldbank.org/source/world-development-indicators>.
8. Skakkebak, N.E.; Lindahl-Jacobsen, R.; Levine, H.; Andersson, A.-M.; Jørgensen, N.; Main, K.M.; Lidegaard, Ø.; Priskorn, L.; Holmboe, S.A.; Bräuner, E. V; et al.

- Environmental Factors in Declining Human Fertility. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2022, 18, 139–157, doi:10.1038/s41574-021-00598-8.
9. Czarnywojtek, A.; Jaz, K.; Ochmańska, A.; Zgorzalewicz-Stachowiak, M.; Czarnocka, B.; Sawicka-Gutaj, N.; Ziółkowska, P.; Krela-Kaźmierczak, I.; Gut, P.; Florek, E.; et al. The Effect of Endocrine Disruptors on the Reproductive System - Current Knowledge. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2021, 25, 4930–4940, doi:10.26355/eurrev\_202108\_26450.
  10. Kamel, R.M. Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. *J. Reprod. Infertil.* 2013, 14, 96–109.
  11. Centers for Disease Control and Prevention 2021 Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic and National Summary Report; US Dept of Health and Human Services, 2023;
  12. Winters, B.R.; Walsh, T.J. The Epidemiology of Male Infertility. *Urol. Clin. North Am.* 2014, 41, 195–204, doi:https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.006.
  13. Meinhardt, A. *Andrology 3rd Edition*—E. Nieschlag, H.M. Behre, S. Nieschlag (Eds). *Asian J. Androl.* 2010, 12, 458.
  14. Saloni, A.; Bettocchi, C.; Capogrosso, P.; Carvalho, J.; Corona, G.; Dinkelman-Smit, M.; Hatzichristodoulou, G.; Jones, T.; Kadioglu, A.; Martinez-Salamanca, J.; et al. *EAU Guidelines on Sexual and Reproductive Health*; EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands, 2024; ISBN 978-94-92671-23-3.
  15. Pozzi, E.; Ramasamy, R.; Salonia, A. Initial Andrological Evaluation of the Infertile Male. *Eur. Urol. Focus* 2023, 9, 51–54, doi:10.1016/j.euf.2022.09.012.
  16. Wang, C.; Mbizvo, M.; Festin, M.P.; Björndahl, L.; Toskin, I. Evolution of the WHO “Semen” Processing Manual from the First (1980) to the Sixth Edition (2021). *Fertil. Steril.* 2022, 117, 237–245, doi:10.1016/j.fertnstert.2021.11.037.
  17. World Health Organization *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*; 6th ed.; WHO Press, Geneva, Switzerland, 2021;
  18. Wosnitzer, M.S.; Goldstein, M. Obstructive Azoospermia. *Urol. Clin. North Am.* 2014,



- 41, 83–95, doi:10.1016/j.ucl.2013.08.013.
19. Agarwal, A.; Parekh, N.; Panner Selvam, M.K.; Henkel, R.; Shah, R.; Homa, S.T.; Ramasamy, R.; Ko, E.; Tremellen, K.; Esteves, S.; et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J. Mens. Health* 2019, 37, 296–312, doi:10.5534/wjmh.190055.
  20. Shah, R. Surgical Sperm Retrieval: Techniques and Their Indications. *Indian J. Urol.* 2011, 27, 102–109, doi:10.4103/0970-1591.78439.
  21. Zhao, G.; Jiang, X.; Zheng, Y.; Bai, H.; Jiang, Z.; Cheng, S.; Li, D. Outcomes Comparison of Testicular versus Ejaculated Sperm for Intracytoplasmic Sperm Injection in Infertile Men with High DNA Fragmentation: Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Transl. Androl. Urol.* Vol 12, No 12 (December 31, 2023) *Transl. Androl. Urol.* 2023.
  22. Rosellen, J.; Steffens, J.; Kranz, J. Testikuläre Spermienextraktion Bei Männlicher Infertilität. *Urologe* 2021, 60, 921–931, doi:10.1007/s00120-021-01480-1.
  23. Čamdžić, N.; Muzika, V.; Čustović, S.; Babić, M.; Dorić, M.; Salčin, E.L.; Kuskunović-Vlahovljak, S. Histological Patterns of Testicular Biopsy in Patients with Azoospermia: Single-Institution Experience. *Acta Marisiensis - Ser. Medica* 2023, 69, 252–255, doi:doi:10.2478/amma-2023-0038.
  24. Söderström, K.O. Tubular Hyalinization in Human Testis. *Andrologia* 1986, 18, 97–103, doi:10.1111/j.1439-0272.1986.tb01746.x.
  25. Schlegel, P.N. Testicular Sperm Extraction: Microdissection Improves Sperm Yield with Minimal Tissue Excision. *Hum. Reprod.* 1999, 14, 131–135, doi:10.1093/humrep/14.1.131.
  26. Donoso, P.; Tournaye, H.; Devroey, P. Which Is the Best Sperm Retrieval Technique for Non-Obstructive Azoospermia? A Systematic Review. *Hum. Reprod. Update* 2007, 13, 539–549, doi:10.1093/humupd/dmm029.
  27. Bernie, A.M.; Mata, D.A.; Ramasamy, R.; Schlegel, P.N. Comparison of

- Microdissection Testicular Sperm Extraction, Conventional Testicular Sperm Extraction, and Testicular Sperm Aspiration for Nonobstructive Azoospermia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fertil. Steril.* 2015, 104, 1093–1099, doi:10.1016/j.fertnstert.2015.07.1136.
28. Corona, G.; Minhas, S.; Giwercman, A.; Bettocchi, C.; Dinkelman-Smit, M.; Dohle, G.; Fusco, F.; Kadioglou, A.; Kliesch, S.; Kopa, Z.; et al. Sperm Recovery and ICSI Outcomes in Men with Non-Obstructive Azoospermia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum. Reprod. Update* 2019, 25, 733–757, doi:10.1093/humupd/dmz028.
  29. Deruyver, Y.; Vanderschueren, D.; Van der Aa, F. Outcome of Microdissection TESE Compared with Conventional TESE in Non-Obstructive Azoospermia: A Systematic Review. *Andrology* 2014, 2, 20–24, doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00148.x.
  30. Ramasamy, R.; Yagan, N.; Schlegel, P.N. Structural and Functional Changes to the Testis after Conventional versus Microdissection Testicular Sperm Extraction. *Urology* 2005, 65, 1190–1194, doi:10.1016/j.urology.2004.12.059.
  31. Matteo, M. Assisted Reproductive Technology. In *Practical Clinical Andrology*; Bettocchi, C., Busetto, G.M., Carrieri, G., Cormio, L., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp. 237–250 ISBN 978-3-031-11701-5.
  32. Chamayou, S.; Giacone, F.; Cannarella, R.; Guglielmino, A. What Does Intracytoplasmic Sperm Injection Change in Embryonic Development? The Spermatozoon Contribution. *J. Clin. Med.* 2023, 12, doi:10.3390/jcm12020671.
  33. Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A.C. Pregnancies after Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon into an Oocyte. *Lancet* (London, England) 1992, 340, 17–18, doi:10.1016/0140-6736(92)92425-f.
  34. Devroey, P.; Van Steirteghem, A. A Review of Ten Years Experience of ICSI. *Hum. Reprod. Update* 2004, 10, 19–28, doi:10.1093/humupd/dmh004.
  35. Ciapa, B.; Arnoult, C. Could Modifications of Signalling Pathways Activated after ICSI Induce a Potential Risk of Epigenetic Defects? *Int. J. Dev. Biol.* 2011, 55, 143–152, doi:10.1387/ijdb.103122bc.

36. Sciorio, R.; Esteves, S.C. Contemporary Use of ICSI and Epigenetic Risks to Future Generations. *J. Clin. Med.* 2022, 11, doi:10.3390/jcm11082135.
37. Paffoni, A.; Vitagliano, A.; Corti, L.; Somigliana, E.; Viganò, P. Intracytoplasmic Sperm Injection versus Conventional in Vitro Insemination in Couples with Non-Male Infertility Factor in the “real-World” Setting: Analysis of the HFEA Registry. *J. Transl. Med.* 2024, 22, 687, doi:10.1186/s12967-024-05515-x.
38. Yang, L.; Liang, F.; Zhu, R.; Wang, Q.; Yao, L.; Zhang, X. Efficacy of Intracytoplasmic Sperm Injection in Women with Non-Male Factor Infertility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2024, 103, 30–41, doi:10.1111/aogs.14698.
39. Suarez, S.S.; Pacey, A.A. Sperm Transport in the Female Reproductive Tract. *Hum. Reprod. Update* 2006, 12, 23–37, doi:10.1093/humupd/dmi047.
40. Sánchez-Calabuig, M.J.; López-Cardona, A.P.; Fernández-González, R.; Ramos-Ibeas, P.; Fonseca Balvís, N.; Laguna-Barraza, R.; Pericuesta, E.; Gutiérrez-Adán, A.; Bermejo-Álvarez, P. Potential Health Risks Associated to ICSI: Insights from Animal Models and Strategies for a Safe Procedure. *Front. public Heal.* 2014, 2, 241, doi:10.3389/fpubh.2014.00241.
41. Vaughan, D.A.; Sakkas, D. Sperm Selection Methods in the 21st Century. *Biol. Reprod.* 2019, 101, 1076–1082, doi:10.1093/biolre/iox032.
42. Baldini, D.; Ferri, D.; Baldini, G.M.; Lot, D.; Catino, A.; Vizziello, D.; Vizziello, G. Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner? *Cells* 2021, 10, doi:10.3390/cells10123566.
43. Henkel, R.R.; Schill, W.-B. Sperm Preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003, 1, 108, doi:10.1186/1477-7827-1-108.
44. Máté, G.; Török, A. Spermiumdiagnostikai- És Szelekciós Eljárások - Sperm Diagnostic and Selection Procedures. *Magy. Noorv. Lapja* 2020, 83, 271–275.
45. Zhao, C.; Sun, L.; Zhao, P. Effects of Sperm Processing Techniques on IVF Pregnancy Rates: A Mini-Review. *Ther. Adv. Reprod. Heal.* 2023, 17, 26334941231188656,

doi:10.1177/26334941231188656.

46. Pinto, S.; Carrageta, D.F.; Alves, M.G.; Rocha, A.; Agarwal, A.; Barros, A.; Oliveira, P.F. Sperm Selection Strategies and Their Impact on Assisted Reproductive Technology Outcomes. *Andrologia* 2021, 53, e13725, doi:10.1111/and.13725.
47. Pesce, M.; De Felici, M. Purification of Mouse Primordial Germ Cells by MiniMACS Magnetic Separation System. *Dev. Biol.* 1995, 170, 722–725, doi:10.1006/dbio.1995.1250.
48. Govers, C.; Berrevoets, C.; Treffers-Westerlaken, E.; Broertjes, M.; Debets, R. Magnetic-Activated Cell Sorting of TCR-Engineered T Cells, Using TCD34 as a Gene Marker, but Not Peptide-MHC Multimers, Results in Significant Numbers of Functional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells. *Hum. Gene Ther. Methods* 2012, 23, 213–224, doi:10.1089/hgtb.2012.074.
49. Ravelo, K.M.; Andersen, N.D.; Monje, P. V Magnetic-Activated Cell Sorting for the Fast and Efficient Separation of Human and Rodent Schwann Cells from Mixed Cell Populations. *Methods Mol. Biol.* 2018, 1739, 87–109, doi:10.1007/978-1-4939-7649-2\_6.
50. Weil, M.-T.; Schulz-Éberlin, G.; Mukherjee, C.; Kuo-Elsner, W.P.; Schäfer, I.; Müller, C.; Simons, M. Isolation and Culture of Oligodendrocytes. *Methods Mol. Biol.* 2019, 1936, 79–95, doi:10.1007/978-1-4939-9072-6\_5.
51. Zhang, H.; Yang, S.; Chen, M.; Tian, D.-S.; Qin, C. Isolation of Mouse Primary Microglia by Magnetic-Activated Cell Sorting in Animal Models of Demyelination. *J. Vis. Exp.* 2022, doi:10.3791/63511.
52. Frauchiger, D.A.; Tekari, A.; May, R.D.; Džafko, E.; Chan, S.C.W.; Stoyanov, J.; Bertolo, A.; Zhang, X.; Guerrero, J.; Sakai, D.; et al. Fluorescence-Activated Cell Sorting Is More Potent to Fish Intervertebral Disk Progenitor Cells Than Magnetic and Beads-Based Methods. *Tissue Eng. Part C. Methods* 2019, 25, 571–580, doi:10.1089/ten.TEC.2018.0375.
53. Tsujisaka, Y.; Hatani, T.; Okubo, C.; Ito, R.; Kimura, A.; Narita, M.; Chonabayashi, K.; Funakoshi, S.; Lucena-Cacace, A.; Toyoda, T.; et al. Purification of Human iPSC-

- Derived Cells at Large Scale Using MicroRNA Switch and Magnetic-Activated Cell Sorting. *Stem cell reports* 2022, 17, 1772–1785, doi:10.1016/j.stemcr.2022.05.003.
54. Dunlap, D.G.; Yang, L.; Qin, S.; Li, K.; Fitch, A.; Huang, L.; McVerry, B.J.; Hand, T.W.; Methé, B.A.; Morris, A. Magnetic-Activated Cell Sorting Identifies a Unique Lung Microbiome Community. *Microbiome* 2023, 11, 117, doi:10.1186/s40168-022-01434-5.
  55. Armstrong, H.; Alipour, M.; Valcheva, R.; Bording-Jorgensen, M.; Jovel, J.; Zaidi, D.; Shah, P.; Lou, Y.; Ebeling, C.; Mason, A.L.; et al. Host Immunoglobulin G Selectively Identifies Pathobionts in Pediatric Inflammatory Bowel Diseases. *Microbiome* 2019, 7, 1, doi:10.1186/s40168-018-0604-3.
  56. Shamloo, A.; Yazdani, A.; Saghafifar, F. Investigation of a Two-Step Device Implementing Magnetophoresis and Dielectrophoresis for Separation of Circulating Tumor Cells from Blood Cells. *Eng. Life Sci.* 2020, 20, 296–304, doi:10.1002/elsc.202000001.
  57. Plouffe, B.D.; Murthy, S.K.; Lewis, L.H. Fundamentals and Application of Magnetic Particles in Cell Isolation and Enrichment: A Review. *Rep. Prog. Phys.* 2015, 78, 16601, doi:10.1088/0034-4885/78/1/016601.
  58. Grunewald, S.; Paasch, U.; Glander, H.J. Enrichment of Non-Apoptotic Human Spermatozoa after Cryopreservation by Immunomagnetic Cell Sorting. *Cell Tissue Bank.* 2001, 2, 127–133, doi:10.1023/A:1020188913551.
  59. Fadok, V.A.; Voelker, D.R.; Campbell, P.A.; Cohen, J.J.; Bratton, D.L.; Henson, P.M. Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages. *J. Immunol.* 1992, 148, 2207–2216.
  60. Garrido, N.; Gil Juliá, M. The Use of Non-Apoptotic Sperm Selected by Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) to Enhance Reproductive Outcomes: What the Evidence Says. *Biology (Basel)*. 2024, 13, doi:10.3390/biology13010030.
  61. Hichri, R.; Amor, H.; Khammari, M.; Harzallah, M.; El Fekih, S.; Saad, A.; Ajina, M.; Ben Ali, H. Apoptotic Sperm Biomarkers and the Correlation between Conventional

- Sperm Parameters and Clinical Characteristics. *Andrologia* 2018, 50, doi:10.1111/and.12813.
62. Said, T.M.; Agarwal, A.; Grunewald, S.; Rasch, M.; Glander, H.-J.; Paasch, U. Evaluation of Sperm Recovery Following Annexin V Magnetic-Activated Cell Sorting Separation. *Reprod. Biomed. Online* 2006, 13, 336–339, doi:10.1016/s1472-6483(10)61437-x.
  63. 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, 25, doi:10.3390/ijms25073627.
  64. Said, T.; Agarwal, A.; Grunewald, S.; Rasch, M.; Baumann, T.; Kriegel, C.; Li, L.; Glander, H.-J.; Thomas, A.J.J.; Paasch, U. Selection of Nonapoptotic Spermatozoa as a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An in Vitro Model. *Biol. Reprod.* 2006, 74, 530–537, doi:10.1095/biolreprod.105.046607.
  65. Lee, T.-H.; Liu, C.-H.; Shih, Y.-T.; Tsao, H.-M.; Huang, C.-C.; Chen, H.-H.; Lee, M.-S. Magnetic-Activated Cell Sorting for Sperm Preparation Reduces Spermatozoa with Apoptotic Markers and Improves the Acrosome Reaction in Couples with Unexplained Infertility. *Hum. Reprod.* 2010, 25, 839–846, doi:10.1093/humrep/deq009.
  66. Zahedi, A.; Tavalaei, M.; Deemeh, M.R.; Azadi, L.; Fazilati, M.; Nasr-Esfahani, M.H. Zeta Potential vs Apoptotic Marker: Which Is More Suitable for ICSI Sperm Selection? *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013, 30, 1181–1186, doi:10.1007/s10815-013-0022-1.
  67. El Fekih, S.; Tous, C.; Gueganic, N.; Brugnol, F.; Ali, H. Ben; Bujan, L.; Moinard, N.; Caire-Tetauru, E.; Ajina, M.; Douet-Guilbert, N.; et al. Decrease of Spermatozoa with an Unbalanced Chromosome Content after Cell Sorting in Men Carrying a Structural Chromosomal Abnormality. *Andrology* 2020, 8, 181–190, doi:10.1111/andr.12643.
  68. Bucar, S.; Gonçalves, A.; Rocha, E.; Barros, A.; Sousa, M.; Sá, R. DNA Fragmentation in Human Sperm after Magnetic-Activated Cell Sorting. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015, 32, 147–154, doi:10.1007/s10815-014-0370-5.

69. Degheidy, T.; Abdelfattah, H.; Seif, A.; Albuz, F.K.; Gazi, S.; Abbas, S. Magnetic Activated Cell Sorting: An Effective Method for Reduction of Sperm DNA Fragmentation in Varicocele Men Prior to Assisted Reproductive Techniques. *Andrologia* 2015, 47, 892–896, doi:10.1111/and.12343.
70. Chi, H.-J.; Kwak, S.-J.; Kim, S.-G.; Kim, Y.-Y.; Park, J.-Y.; Yoo, C.-S.; Park, I.-H.; Sun, H.-G.; Kim, J.-W.; Lee, K.-H. Efficient Isolation of Sperm with High DNA Integrity and Stable Chromatin Packaging by a Combination of Density-Gradient Centrifugation and Magnetic-Activated Cell Sorting. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2016, 43, 199–206, doi:10.5653/cerm.2016.43.4.199.
71. Aziz, N.; Said, T.; Paasch, U.; Agarwal, A. The Relationship between Human Sperm Apoptosis, Morphology and the Sperm Deformity Index. *Hum. Reprod.* 2007, 22, 1413–1419, doi:10.1093/humrep/dem016.
72. de Vantéry Arrighi, C.; Lucas, H.; Chardonnens, D.; de Agostini, A. Removal of Spermatozoa with Externalized Phosphatidylserine from Sperm Preparation in Human Assisted Medical Procreation: Effects on Viability, Motility and Mitochondrial Membrane Potential. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009, 7, 1, doi:10.1186/1477-7827-7-1.
73. Martínez, M.G.; Sánchez-Martín, P.; Dorado-Silva, M.; Fernández, J.L.; Girones, E.; Johnston, S.D.; Gosálvez, J. Magnetic-Activated Cell Sorting Is Not Completely Effective at Reducing Sperm DNA Fragmentation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018, 35, 2215–2221, doi:10.1007/s10815-018-1319-x.
74. Esbert, M.; Godo, A.; Soares, S.R.; Florensa, M.; Amorós, D.; Ballesteros, A.; Vidal, F. Spermatozoa with Numerical Chromosomal Abnormalities Are More Prone to Be Retained by Annexin V-MACS Columns. *Andrology* 2017, 5, 807–813, doi:10.1111/andr.12376.
75. Lundin, K.; Bentzen, J.G.; Bozdog, G.; Ebner, T.; Harper, J.; Le Clef, N.; Moffett, A.; Norcross, S.; Polyzos, N.P.; Rautakallio-Hokkanen, S.; et al. Good Practice Recommendations on Add-Ons in Reproductive Medicine†. *Hum. Reprod.* 2023, 38, 2062–2104, doi:10.1093/humrep/dead184.
76. Lepine, S.; McDowell, S.; Searle, L.M.; Kroon, B.; Glujovsky, D.; Yazdani, A. Advanced Sperm Selection Techniques for Assisted Reproduction. *Cochrane database*

- Syst. Rev. 2019, 7, CD010461, doi:10.1002/14651858.CD010461.pub3.
77. Mei, J.; Chen, L.-J.; Zhu, X.-X.; Yu, W.; Gao, Q.-Q.; Sun, H.-X.; Ding, L.-J.; Wang, J.-X. Magnetic-Activated Cell Sorting of Nonapoptotic Spermatozoa with a High DNA Fragmentation Index Improves the Live Birth Rate and Decreases Transfer Cycles of IVF/ICSI. *Asian J. Androl.* 2022, 24, 367–372, doi:10.4103/aja202161.
  78. Gervasi, M.G.; Visconti, P.E. Molecular Changes and Signaling Events Occurring in Spermatozoa during Epididymal Maturation. *Andrology* 2017, 5, 204–218, doi:10.1111/andr.12320.
  79. Beauchamp, P.J.; Galle, P.C.; Blasco, L. Human Sperm Velocity and Postinsemination Cervical Mucus Test in the Evaluation of the Infertile Couple. *Arch. Androl.* 1984, 13, 107–112, doi:10.3109/01485018408987508.
  80. Ortega, C.; Verheyen, G.; Raick, D.; Camus, M.; Devroey, P.; Tournaye, H. Absolute Asthenozoospermia and ICSI: What Are the Options? *Hum. Reprod. Update* 2011, 17, 684–692, doi:10.1093/humupd/dmr018.
  81. Chen, T.; Fan, D.; Wang, X.; Mao, C.; Chu, Y.; Zhang, H.; Liu, W.; Ding, S.; Liu, Q.; Yuan, M.; et al. ICSI Outcomes for Infertile Men with Severe or Complete Asthenozoospermia. *Basic Clin. Androl.* 2022, 32, 6, doi:10.1186/s12610-022-00155-x.
  82. Nagy, Z.P.; Liu, J.; Joris, H.; Verheyen, G.; Tournaye, H.; Camus, M.; Derde, M.C.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A.C. The Result of Intracytoplasmic Sperm Injection Is Not Related to Any of the Three Basic Sperm Parameters. *Hum. Reprod.* 1995, 10, 1123–1129, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136104.
  83. Hecht, B.R.; Jeyendran, R.S. The Hypo-Osmotic Swelling Test: Is It a Sperm Vitality or a Viability Assay? *F&S Sci.* 2022, 3, 18–20, doi:https://doi.org/10.1016/j.xfss.2021.11.001.
  84. Soares, J.B.; Glina, S.; Antunes, N.J.; Wonchockier, R.; Galuppo, A.G.; Mizrahi, F.E. Sperm Tail Flexibility Test: A Simple Test for Selecting Viable Spermatozoa for Intracytoplasmic Sperm Injection from Semen Samples without Motile Spermatozoa. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paulo.* 2003, 58, 250–253, doi:10.1590/s0041-



87812003000500003.

85. Liu, J.; Tsai, Y.L.; Katz, E.; Compton, G.; Garcia, J.E.; Baramki, T.A. High Fertilization Rate Obtained after Intracytoplasmic Sperm Injection with 100% Nonmotile Spermatozoa Selected by Using a Simple Modified Hypo-Osmotic Swelling Test. *Fertil. Steril.* 1997, 68, 373–375, doi:10.1016/s0015-0282(97)81533-6.
86. Aktan, T.M.; Montag, M.; Duman, S.; Gorkemli, H.; Rink, K.; Yurdakul, T. Use of a Laser to Detect Viable but Immotile Spermatozoa. *Andrologia* 2004, 36, 366–369, doi:10.1111/j.1439-0272.2004.00636.x.
87. Yovich, J.M.; Edirisinghe, W.R.; Cummins, J.M.; Yovich, J.L. Preliminary Results Using Pentoxifylline in a Pronuclear Stage Tubal Transfer (PROST) Program for Severe Male Factor Infertility. *Fertil. Steril.* 1988, 50, 179–181, doi:10.1016/s0015-0282(16)60030-4.
88. Ebner, T.; Shebl, O.; Mayer, R.B.; Moser, M.; Costamoling, W.; Oppelt, P. Healthy Live Birth Using Theophylline in a Case of Retrograde Ejaculation and Absolute Asthenozoospermia. *Fertil. Steril.* 2014, 101, 340–343, doi:10.1016/j.fertnstert.2013.10.006.
89. Baccetti, B. Microscopical Advances in Assisted Reproduction. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2004, 36, 333–339.
90. Esteves, S.C.; Sharma, R.K.; Thomas, A.J.J.; Agarwal, A. Suitability of the Hypo-Osmotic Swelling Test for Assessing the Viability of Cryopreserved Sperm. *Fertil. Steril.* 1996, 66, 798–804.
91. Hauser, R.; Yavetz, H.; Paz, G.F.; Homonnai, Z.T.; Amit, A.; Lessing, J.B.; Peyser, M.R.; Yogeve, L. The Predictive Fertilization Value of the Hypoosmotic Swelling Test (HOST) for Fresh and Cryopreserved Sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1992, 9, 265–270, doi:10.1007/BF01203826.
92. Agarwal, A.; Sharma, R.K.; Gupta, S.; Boitrelle, F.; Finelli, R.; Parekh, N.; Durairajanayagam, D.; Saleh, R.; Arafa, M.; Cho, C.L.; et al. Sperm Vitality and Necrozoospermia: Diagnosis, Management, and Results of a Global Survey of Clinical Practice. *World J. Mens. Health* 2022, 40, 228–242, doi:10.5534/wjmh.210149.

93. Khodamoradi, K.; Kuchakulla, M.; Narasimman, M.; Khosravizadeh, Z.; Ali, A.; Brackett, N.; Ibrahim, E.; Ramasamy, R. Laboratory and Clinical Management of Leukocytospermia and Hematospermia: A Review. *Ther. Adv. Reprod. Heal.* 2020, 14, 2633494120922511, doi:10.1177/2633494120922511.
94. Henkel, R. Leukocytospermia and/or Bacteriospermia: Impact on Male Infertility. *J. Clin. Med.* 2024, 13, doi:10.3390/jcm13102841.
95. Wolff, H. The Biologic Significance of White Blood Cells in Semen. *Fertil. Steril.* 1995, 63, 1143–1157, doi:10.1016/s0015-0282(16)57588-8.
96. Mongioi, L.M.; Alamo, A.; Calogero, A.E.; Compagnone, M.; Giacone, F.; Cannarella, R.; La Vignera, S.; Condorelli, R.A. Evaluation of Seminal Fluid Leukocyte Subpopulations in Patients with Varicocele. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2020, 34, 2058738420925719.
97. Close, C.E.; Roberts, P.L.; Berger, R.E. Cigarettes, Alcohol and Marijuana Are Related to Pyospermia in Infertile Men. *J. Urol.* 1990, 144, 900–903, doi:10.1016/s0022-5347(17)39618-0.
98. Schober, J.M.; Dulabon, L.M.; Gor, R.A.; Woodhouse, C.R.J. Pyospermia in an Adult Cohort with Persistent Lower Urinary Tract Symptoms and a History of Ablated Posterior Urethral Valve. *J. Pediatr. Urol.* 2010, 6, 614–618, doi:https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2010.09.003.
99. Saleh, R.A.; Agarwal, A.; Kandirali, E.; Sharma, R.K.; Thomas, A.J.; Nada, E.A.; Evenson, D.P.; Alvarez, J.G. Leukocytospermia Is Associated with Increased Reactive Oxygen Species Production by Human Spermatozoa. *Fertil. Steril.* 2002, 78, 1215–1224, doi:10.1016/s0015-0282(02)04237-1.
100. Derbel, R.; Sellami, H.; Sakka, R.; Ben Slima, A.; Mkaddem, I.; Gdoura, R.; Mcelreavey, E.; Ammar-Keskes, L. Relationship between Nuclear DNA Fragmentation, Mitochondrial DNA Damage and Standard Sperm Parameters in Spermatozoa of Infertile Patients with Leukocytospermia. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2021, 50, 102101, doi:10.1016/j.jogoh.2021.102101.
101. Fan, S.; Zhao, Y.; Zhang, Z.; Wang, H.; Hou, Y.; Bai, S.; Liu, R.; Xu, B. Effect of

- Leukocytes on Semen Quality in Men from Primary and Secondary Infertile Couples: A Cross-Sectional Study. *Heal. Sci. reports* 2023, 6, e1683, doi:10.1002/hsr2.1683.
102. Fraczek, M.; Hryhorowicz, M.; Gill, K.; Zarzycka, M.; Gaczarzewicz, D.; Jedrzejczak, P.; Bilinska, B.; Piasecka, M.; Kurpisz, M. The Effect of Bacteriospermia and Leukocytospermia on Conventional and Nonconventional Semen Parameters in Healthy Young Normozoospermic Males. *J. Reprod. Immunol.* 2016, 118, 18–27, doi:10.1016/j.jri.2016.08.006.
103. Plante, M.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. Reactive Oxygen Species Released by Activated Neutrophils, but Not by Deficient Spermatozoa, Are Sufficient to Affect Normal Sperm Motility. *Fertil. Steril.* 1994, 62, 387–393, doi:10.1016/s0015-0282(16)56895-2.
104. Aitken, R.J.; West, K.; Buckingham, D. Leukocytic Infiltration into the Human Ejaculate and Its Association with Semen Quality, Oxidative Stress, and Sperm Function. *J. Androl.* 1994, 15, 343–352.
105. Fedder, J.; Ellerman-Eriksen, S. Effect of Cytokines on Sperm Motility and Ionophore-Stimulated Acrosome Reaction. *Arch. Androl.* 1995, 35, 173–185, doi:10.3109/01485019508987870.
106. Mathers, M.J.; Degener, S.; Sperling, H.; Roth, S. Hematospermia-a Symptom With Many Possible Causes. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2017, 114, 186–191, doi:10.3238/arztebl.2017.0186.
107. Soygur, B.; Celik, S.; Celik-Ozenci, C.; Sati, L. Effect of Erythrocyte-Sperm Separation Medium on Nuclear, Acrosomal, and Membrane Maturity Parameters in Human Sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018, 35, 491–501, doi:10.1007/s10815-017-1085-1.
108. Yazdinejad, F.; Heydari, L.; Motamed Zadeh, L.; Seifati, S.M.; Agha-Rahimi, A. Application of Erythrocyte Lysing Buffer (ELB) Has Detrimental Effects on Human Sperm Quality Parameters, DNA Fragmentation and Chromatin Structure. *Andrologia* 2020, 52, e13702, doi:10.1111/and.13702.
109. Popal, W.; Nagy, Z.P. Laboratory Processing and Intracytoplasmic Sperm Injection

- Using Epididymal and Testicular Spermatozoa: What Can Be Done to Improve Outcomes? *Clinics (Sao Paulo)*. 2013, 68 Suppl 1, 125–130, doi:10.6061/clinics/2013(sup01)14.
110. Tournaye, H.; Wieme, P.; Janssens, R.; Verheyen, G.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A. Incubation of Spermatozoa from Asthenozoospermic Semen Samples with Pentoxifylline and 2-Deoxyadenosine: Variability in Hyperactivation and Acrosome Reaction Rates. *Hum. Reprod.* 1994, 9, 2038–2043, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138390.
111. Rijsselaere, T.; Van Soom, A.; Maes, D.; Verberckmoes, S.; de Kruif, A. Effect of Blood Admixture on in Vitro Survival of Chilled and Frozen-Thawed Canine Spermatozoa. *Theriogenology* 2004, 61, 1589–1602, doi:10.1016/j.theriogenology.2003.09.008.
112. Bernard, A.; Boumsell, L. [Human leukocyte differentiation antigens]. *Presse Med.* 1984, 13, 2311–2316.
113. Tian, H.-F.; Xing, J.; Tang, X.-Q.; Chi, H.; Sheng, X.-Z.; Zhan, W.-B. Cluster of Differentiation Antigens: Essential Roles in the Identification of Teleost Fish T Lymphocytes. *Mar. life Sci. Technol.* 2022, 4, 303–316, doi:10.1007/s42995-022-00136-z.
114. Rheinländer, A.; Schraven, B.; Bommhardt, U. CD45 in Human Physiology and Clinical Medicine. *Immunol. Lett.* 2018, 196, 22–32, doi:https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009.
115. Karsten, U.; Butschak, G.; Stahn, R.; Goletz, S. A Novel Series of Anti-Human Glycophorin A (CD235a) Antibodies Defining Five Extra- and Intracellular Epitopes. *Int. Immunopharmacol.* 2010, 10, 1354–1360, doi:https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.001.
116. Ridgwell, K.; Tanner, M.J.; Anstee, D.J. The Wrb Antigen, a Receptor for Plasmodium Falciparum Malaria, Is Located on a Helical Region of the Major Membrane Sialoglycoprotein of Human Red Blood Cells. *Biochem. J.* 1983, 209, 273–276, doi:10.1042/bj2090273.

117. Sharma, R.; Ahmad, G.; Esteves, S.C.; Agarwal, A. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase DUTP Nick End Labeling (TUNEL) Assay Using Bench Top Flow Cytometer for Evaluation of Sperm DNA Fragmentation in Fertility Laboratories: Protocol, Reference Values, and Quality Control. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016, 33, 291–300, doi:10.1007/s10815-015-0635-7.
118. Fernández, J.L.; Muriel, L.; Rivero, M.T.; Goyanes, V.; Vazquez, R.; Alvarez, J.G. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *J. Androl.* 2003, 24, 59–66.
119. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 2007, 35, 495–516, doi:10.1080/01926230701320337.
120. Szeberényi, J. Programozott Sejthalál. In *Molekuláris sejtbológia; Dialóg Campus*, 2011; pp. 306–312 ISBN 9789639950542.
121. Asadi, A.; Ghahremani, R.; Abdolmaleki, A.; Rajaei, F. Role of Sperm Apoptosis and Oxidative Stress in Male Infertility: A Narrative Review. *Int. J. Reprod. Biomed.* 2021, 19, 493–504, doi:10.18502/ijrm.v19i6.9371.
122. Francavilla, S.; D'Abrizio, P.; Cordeschi, G.; Pelliccione, F.; Necozone, S.; Ulisse, S.; Properzi, G.; Francavilla, F. Fas Expression Correlates with Human Germ Cell Degeneration in Meiotic and Post-Meiotic Arrest of Spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 2002, 8, 213–220, doi:10.1093/molehr/8.3.213.
123. Porcelli, F.; Meggiolaro, D.; Carnevali, A.; Ferrandi, B. Fas Ligand in Bull Ejaculated Spermatozoa: A Quantitative Immunocytochemical Study. *Acta Histochem.* 2006, 108, 287–292, doi:10.1016/j.acthis.2006.05.006.
124. Sakkas, D.; Mariethoz, E.; St John, J.C. Abnormal Sperm Parameters in Humans Are Indicative of an Abortive Apoptotic Mechanism Linked to the Fas-Mediated Pathway. *Exp. Cell Res.* 1999, 251, 350–355, doi:10.1006/excr.1999.4586.
125. Sakkas, D.; Seli, E.; Bizzaro, D.; Tarozzi, N.; Manicardi, G.C. Abnormal Spermatozoa in the Ejaculate: Abortive Apoptosis and Faulty Nuclear Remodelling during Spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online* 2003, 7, 428–432, doi:10.1016/s1472-6483(10)61886-x.

126. Grunewald, S.; Fitzl, G.; Springsguth, C. Induction of Ultra-Morphological Features of Apoptosis in Mature and Immature Sperm. *Asian J. Androl.* 2017, 19, 533–537, doi:10.4103/1008-682X.180974.
127. Cayli, S.; Sakkas, D.; Vigue, L.; Demir, R.; Huszar, G. Cellular Maturity and Apoptosis in Human Sperm: Creatine Kinase, Caspase-3 and Bcl-XL Levels in Mature and Diminished Maturity Sperm. *Mol. Hum. Reprod.* 2004, 10, 365–372, doi:10.1093/molehr/gah050.
128. Joshi, A.R.; Dighe, R.R. Expression of Apoptotic Genes in Testicular Germ Cells and Their Modulation by Luteinizing Hormone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2006, 101, 22–30, doi:https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.06.002.
129. Weng, S.-L.; Taylor, S.L.; Morshedi, M.; Schuffner, A.; Duran, E.H.; Beebe, S.; Oehninger, S. Caspase Activity and Apoptotic Markers in Ejaculated Human Sperm. *Mol. Hum. Reprod.* 2002, 8, 984–991, doi:10.1093/molehr/8.11.984.
130. Grunewald, S.; Kriegel, C.; Baumann, T.; Glander, H.-J.; Paasch, U. Interactions between Apoptotic Signal Transduction and Capacitation in Human Spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2009, 24, 2071–2078, doi:10.1093/humrep/dep178.
131. Grunewald, S.; Said, T.M.; Paasch, U.; Glander, H.; Agarwal, A. Relationship between Sperm Apoptosis Signalling and Oocyte Penetration Capacity. *Int. J. Androl.* 2008, 31, 325–330.
132. Grunewald, S.; Reinhardt, M.; Blumenauer, V.; Said, T.M.; Agarwal, A.; Abu Hmeidan, F.; Glander, H.-J.; Paasch, U. Increased Sperm Chromatin Decondensation in Selected Nonapoptotic Spermatozoa of Patients with Male Infertility. *Fertil. Steril.* 2009, 92, 572–577, doi:10.1016/j.fertnstert.2008.07.1705.
133. Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N.; Finnie, J.M.; Hedges, A.; McLachlan, R.I. Analysis of the Relationships between Oxidative Stress, DNA Damage and Sperm Vitality in a Patient Population: Development of Diagnostic Criteria. *Hum. Reprod.* 2010, 25, 2415–2426, doi:10.1093/humrep/deq214.
134. Brahem, S.; Jellad, S.; Ibala, S.; Saad, A.; Mehdi, M. DNA Fragmentation Status in Patients with Necrozoospermia. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2012, 58, 319–323,

doi:10.3109/19396368.2012.710869.

135. Samplaski, M.K.; Dimitromanolakis, A.; Lo, K.C.; Grober, E.D.; Mullen, B.; Garbens, A.; Jarvi, K.A. The Relationship between Sperm Viability and DNA Fragmentation Rates. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015, 13, 42, doi:10.1186/s12958-015-0035-y.
136. Jayaraman, V.; Upadhya, D.; Narayan, P.K.; Adiga, S.K. Sperm Processing by Swim-up and Density Gradient Is Effective in Elimination of Sperm with DNA Damage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012, 29, 557–563, doi:10.1007/s10815-012-9742-x.
137. Muratori, M.; Tarozzi, N.; Carpentiero, F.; Danti, S.; Perrone, F.M.; Cambi, M.; Casini, A.; Azzari, C.; Boni, L.; Maggi, M.; et al. Sperm Selection with Density Gradient Centrifugation and Swim up: Effect on DNA Fragmentation in Viable Spermatozoa. *Sci. Rep.* 2019, 9, 7492, doi:10.1038/s41598-019-43981-2.
138. Oguz, Y.; Guler, I.; Erdem, A.; Mutlu, M.F.; Gumuslu, S.; Oktem, M.; Bozkurt, N.; Erdem, M. The Effect of Swim-up and Gradient Sperm Preparation Techniques on Deoxyribonucleic Acid (DNA) Fragmentation in Subfertile Patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018, 35, 1083–1089, doi:10.1007/s10815-018-1163-z.
139. Viswambharan, N.; Murugan, M. Effect of Wash and Swim-up and Density Gradient Sperm Preparation on Sperm DNA Fragmentation. *Mater. Today Proc.* 2021.
140. Parrella, A.; Keating, D.; Cheung, S.; Xie, P.; Stewart, J.D.; Rosenwaks, Z.; Palermo, G.D. A Treatment Approach for Couples with Disrupted Sperm DNA Integrity and Recurrent ART Failure. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019, 36, 2057–2066, doi:10.1007/s10815-019-01543-5.
141. Le, M.T.; Nguyen, T.A.T.; Nguyen, H.T.T.; Nguyen, T.T.T.; Nguyen, V.T.; Le, D.D.; Nguyen, V.Q.H.; Cao, N.T. Does Sperm DNA Fragmentation Correlate with Semen Parameters? *Reprod. Med. Biol.* 2019, 18, 390–396, doi:10.1002/rmb2.12297.
142. Chen, L.; Fang, J.; Jiang, W.; Wang, J.; Li, D. Effects of the Sperm DNA Fragmentation Index on the Clinical and Neonatal Outcomes of Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles. *J. Ovarian Res.* 2020, 13, 52, doi:10.1186/s13048-020-00658-z.

143. Gil Juliá, M.; Hervas, I.; Navarro-Gomezlechón, A.; Mossetti, L.; Quintana, F.; Amoros, D.; Pacheco, A.; Gonzalez-Ravina, C.; Rivera-Egea, R.; Garrido, N. Semen Processing Using Magnetic-Activated Cell Sorting before ICSI Is Deemed Safe for Obstetric and Perinatal Outcomes: A Retrospective Multicentre Study. *Reprod. Biomed. Online* 2023, 47, 103172, doi:10.1016/j.rbmo.2023.01.022.
144. Koçak, I.; Yenisey, C.; DüNDAR, M.; Okyay, P.; Serter, M. Relationship between Seminal Plasma Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor Alpha Levels with Semen Parameters in Fertile and Infertile Men. *Urol. Res.* 2002, 30, 263–267, doi:10.1007/s00240-002-0269-y.
145. Martínez, P.; Proverbio, F.; Camejo, M.I. Sperm Lipid Peroxidation and Pro-Inflammatory Cytokines. *Asian J. Androl.* 2007, 9, 102–107, doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00238.x.
146. Eggert-Kruse, W.; Boit, R.; Rohr, G.; Aufenanger, J.; Hund, M.; Strowitzki, T. Relationship of Seminal Plasma Interleukin (IL) -8 and IL-6 with Semen Quality. *Hum. Reprod.* 2001, 16, 517–528, doi:10.1093/humrep/16.3.517.
147. Krausz, C.; West, K.; Buckingham, D.; Aitken, R.J. Development of a Technique for Monitoring the Contamination of Human Semen Samples with Leukocytes. *Fertil. Steril.* 1992, 57, 1317–1325, doi:10.1016/s0015-0282(16)55094-8.
148. Ochsendorf, F.R.; Beschmann, H.A.; Neuhauser, S.; Milbradt, R. CD 45/67 Immunobead Preparation of Human Semen Activates Granulocytes. *Andrologia* 1997, 29, 193–199, doi:10.1111/j.1439-0272.1997.tb00316.x.
149. Hipler, U.C.; Schreiber, G.; Wollina, U. Reactive Oxygen Species in Human Semen: Investigations and Measurements. *Arch. Androl.* 1998, 40, 67–78, doi:10.3109/01485019808987929.
150. Ali Hassan, H.; Banchi, P.; Domain, G.; El Khoury, R.; Chaaya, R.; Wydooghe, E.; Smits, K.; Van Soom, A. A Comparative Study of Canine Epididymal Sperm Collection Techniques and Cryopreservation. *Front. Vet. Sci.* 2023, 10, 1181054, doi:10.3389/fvets.2023.1181054.
151. Stohs, S.J.; Bagchi, D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. *Free*



Radic. Biol. Med. 1995, 18, 321–336, doi:10.1016/0891-5849(94)00159-h.

152. Adams, J.D.; Kim, U.; Soh, H.T. Multitarget Magnetic Activated Cell Sorter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008, 105, 18165–18170, doi:10.1073/pnas.0809795105.

## 10. Ábrák, táblázatok jegyzéke

---

### ÁBRÁK

1. ábra: Globális fertilitási trendek 1960-2018 [7] 7
2. ábra: MACS működésének alapelve [63] 19
3. 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. 29
4. ábra: A spermiumok vitalitásának és a DNS-fragmentáció korrelációja. (A) DNS-fragmentáció (fehér oszlop), spermium koncentráció (szürke oszlop), motilitás (vízszintesen vonalazott oszlop), progresszív motilitás (függőlegesen vonalazott oszlop) normális vitalitás vs. necrozoospermia esetén. (B) Vitalitás (pontozott oszlop), spermium koncentráció (szürke oszlop), motilitás (vízszintesen vonalazott oszlop), progresszív motilitás (függőlegesen vonalazott oszlop) alacsony vs. magas DNS-fragmentáció esetén. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Kruskal-Wallis teszt. 31
5. ábra: Spermiumok vitalitása a mágneses szeparálás előtt (A) és után (B). A sejteket eosin festékkel jelöltük. Az élő spermiumok színtelenek, míg a halott sejtek vörösen festődnek. 32
6. ábra: DNS-fragmentáció mértéke a mágneses szeparálás előtt (A) és után (B). A sejteket az SCD módszer szerint jelöltük. Az egészséges sejtek feji része körül kiterjedt „halo” jelenség figyelhető meg (zöld négyzetekben), míg a fragmentált DNS-sel bíró sejtek körül minimális vagy egyáltalán nincs (piros négyzet). 32
7. ábra: CD45+ sejtek aránya a mágneses szeparáció előtt és után. \*\*\* $p < 0,001$ ; kétmintás t-próba. 33
8. ábra: Fénymikroszkópos kép a vörösvértetek számának szemléltetésére a CD235a+ sejtek mágneses szeparációja előtt (A) és után (B). Vörösvértetek száma a szeparáció előtt és után (C). \*\*\* $p < 0,001$ ; kétmintás t-próba. 34
9. ábra: A spermium sejtek annexin V pozitívitasának sematikus ábrázolása. A non-viabilis sejtek propidium-jodiddal (PI) jelölhetők, de néhány esetben ezen sejtek annexin V pozitívitas is mutathatnak. 37

## TÁBLÁZATOK

1. táblázat: Férfi meddőség okai és százalékos eloszlása [13,14] 9
2. táblázat: Klasszikus paraméterek alsó referencia határai (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th edition, 2021 alapján [17] ) 10
3. táblázat: Fejlett spermium szelekciós technikák összefoglalása [46] 17

## 11. 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.



## 12. 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.*



Article

# An Alternative Application of Magnetic-Activated Cell Sorting: CD45 and CD235a Based Purification of Semen and Testicular Tissue Samples

Péter Czétány<sup>1,2</sup>, András Balló<sup>1,2,3</sup>, László Márk<sup>2,4,5</sup>, Attila Török<sup>3</sup> , Árpád Szántó<sup>1,2,\*</sup> and Gábor Máté<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Urology Clinic, University of Pécs Clinical Centre, 7621 Pécs, Hungary; czetany.peter@pte.hu (P.C.); ballo.andras@pte.hu (A.B.); mate.gabor@pri.hu (G.M.)

<sup>2</sup> National Laboratory on Human Reproduction, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; laszlo.mark@aok.pte.hu

<sup>3</sup> Pannon Reproduction Institute, 8300 Tapolca, Hungary; drtoroka@t-online.hu

<sup>4</sup> Department of Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Hungary

<sup>5</sup> MTA-PTE Human Reproduction Scientific Research Group, 7624 Pécs, Hungary

\* Correspondence: szanto.arpad@pte.hu

**Abstract:** Magnetic activated cell sorting (MACS) is a well-known sperm selection technique, which is able to remove apoptotic spermatozoa from semen samples using the classic annexinV based method. Leukocytes and erythrocytes in semen samples or in testicular tissue processed for in vitro fertilization (IVF) could exert detrimental effects on sperm. In the current study, we rethought the aforementioned technique and used magnetic microbeads conjugated with anti-CD45/CD235a antibodies to eliminate contaminating leukocytes and erythrocytes from leukocytospermic semen samples and testicular tissue samples gained via testicular sperm extraction (TESE). With this technique, a 15.7- and a 30.8-fold reduction could be achieved in the ratio of leukocytes in semen and in the number of erythrocytes in TESE samples, respectively. Our results show that MACS is a method worth to reconsider, with more potential alternative applications. Investigations to find molecules labeling high-quality sperm population and the development of positive selection procedures based on these might be a direction of future research.

**Keywords:** annexin V; assisted reproduction; erythrocyte; leukocyte; magnetic activated cell sorting; magnetic bead; sperm



**Citation:** 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**, *25*, 3627. <https://doi.org/10.3390/ijms25073627>

Academic Editor: Jan Tesarik

Received: 14 February 2024

Revised: 18 March 2024

Accepted: 23 March 2024

Published: 24 March 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

A global crisis of human fertility is developing since the mid-20th century, currently 1 in every 6 people is affected according to the World Health Organisation (WHO) [1]. For this population, assisted reproduction techniques (ARTs) offer a chance to have their own biological offspring since its first success in 1978 [2]. Despite their worldwide use, the efficacy of ARTs is still relatively low: 37.3% of ART cycles resulted in live-birth deliveries in the USA in 2021 [3].

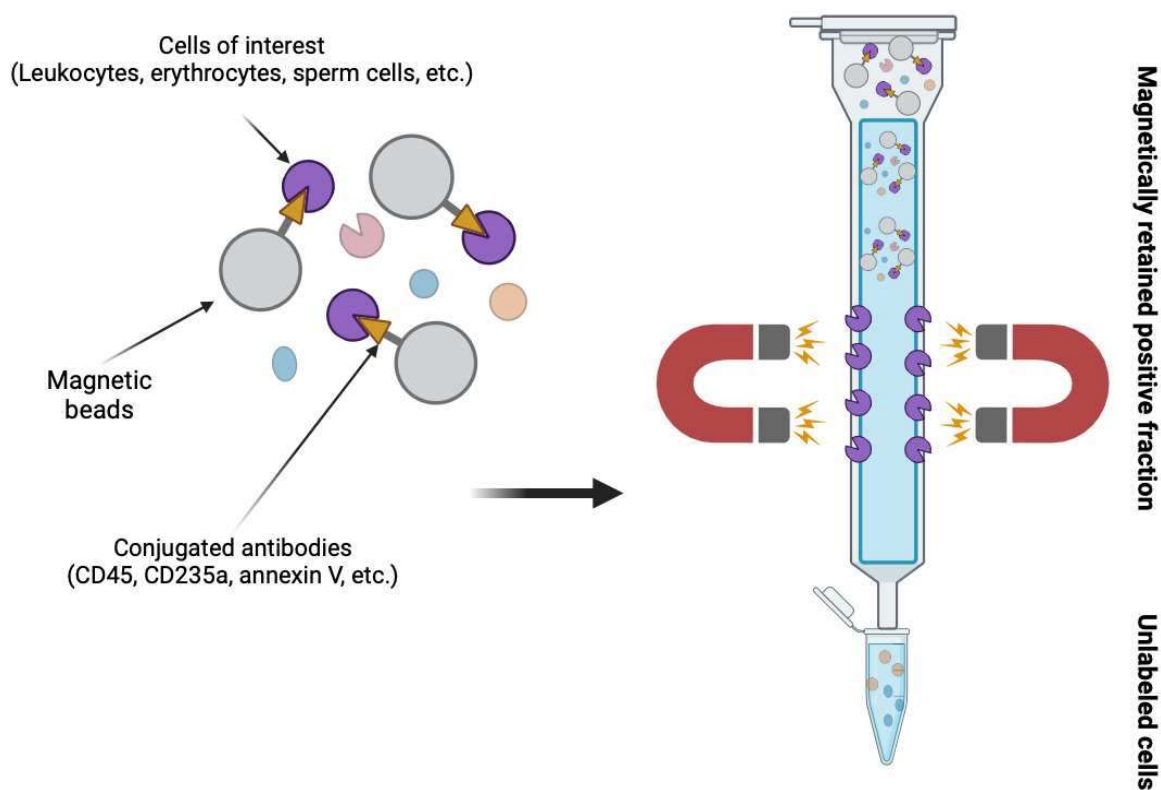
The male factor is present in 30 to 50% of infertile couples [4]. With ARTs (especially with intracytoplasmic sperm injection (ICSI)) several natural mechanisms (vaginal acidic pH, cervical mucus, cellular immune response, sperm-epithelial interactions in the caudal isthmus of the Fallopian tube, sperm-zona pellucida interactions [5,6]), resulting in selection of the sperm subpopulation with highest fertilization potential, are bypassed. Thus, presumably with the isolation and use of these particular cells, it might raise the success rate of assisted reproduction. For this purpose, many sperm selection techniques have been developed: the swim-up test (SU) and the densitygradient centrifugation (DGC) are routinely used. SU is one of the simplest, fastest, cheapest and most commonly used methods. It is based on the migration of the healthy spermatozoa. The sample is placed in

a tube placed in a 45° angle with a layer of culture medium on top. After certain time of incubation (usually 1 h) a motile fraction of sperm can be harvested from the upper layer, with high probability of normal morphology and higher DNA integrity. The drawback of the technique is the low percentage (circa 5–10%) of cells retrieved. DGC is based on different densities of normal/abnormal sperm, contaminating cells and debris in semen samples. A density gradient is formed from the colloidal suspension of silica particles, and after centrifugation the lower phase contains the better-quality sperm subpopulation, while the abnormal spermatozoa, other cells, non-cellular contaminants can be found in the upper phase. One possible disadvantage can be the formation of reactive oxygen species (ROS), although its chance could be minimized with the application of the lowest possible centrifugal force (generally 300× *g* for 20 min). In some specific, more complicated case (severe oligozoospermia, high viscosity) these conventional selection techniques could be inefficient [7]. In these occasions, the advanced sperm selection methods (e.g., microfluidic devices, physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI)) can improve the results, though these are sporadically applied depending on their accessibility and preferences of the fertility centre. None of these methods has been proven to be unequivocally beneficial in large studies, so their routine application cannot be recommended yet [8,9]. In this regard further studies are needed. In the clinical practice, sperm selection is still based on the subjective (mainly morphological) evaluation and expertise of the embryologist.

The methodology of magnetic activated cell sorting (MACS) was published first in 1995 by Pesce and De Felici [10], to separate primordial germ cells of mouse embryos from somatic cells. It is commonly used in immunology, oncological research, neuroscience and stem cell research [11–16]. Dunlap et al. [17] used the method to identify immunoglobulin (Ig) G-bound bacteria from bronchoalveolar lavage samples to study lung microbiome. The technique was applied to identify IgG-bound bacteria participating in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) [18]. Different cell selection strategies exist, the predominant method is based on cell surface markers using ligands targeting them. These ligands are most frequently antibodies, but synthetic molecules like aptamers and peptides have been developed as well. Label-free magnetic cell sorting is also a viable option in case of specific cells containing paramagnetic materials (e.g., hem molecule in erythrocytes) providing intrinsic susceptibility for magnetophoresis. Shamloo and his colleagues developed a two-step microfluidic device which could separate circulating tumor cells from erythrocytes, platelets and leukocytes based partially on this phenomenon [19].

In reproductive medicine, it was applied for the first time by Grunewald et al. in 2001 to eliminate apoptotic spermatozoa from cryopreserved semen samples [20]. Apoptotic cells show several intracellular alterations and molecular changes in the plasma membrane. One of the latter is the externalisation of phosphatidylserine (PS), which is a phospholipid located normally on the inner surface of the cell membrane [21]. Unfortunately, spermatozoa can carry this and other early signs of apoptosis without significant impact on morphology or motility, thus it can escape further phases of programmed cell death and fertilise the oocyte [22]. In a study by Hichri et al. showed that distinct apoptotic alterations (the ratio of activated caspases, externalized PS, DNA-fragmentation) are reliable predictors of ART outcomes independently of conventional sperm parameters, DNA-fragmentation with best predictive value [23]. The original method is based on the binding of PS to a protein named annexin V, showing high affinity to this molecule. Annexin V is conjugated to the surface of magnetic microbeads placed in a separation column and exposed to magnetic field. Sperm sample is loaded into the column, apoptotic spermatozoa bind to annexin V and are retained in the column (positive fraction). Non-apoptotic spermatozoa can be eluted through the column (negative fraction) and separated for further application (Figure 1) [24]. Many studies proved that MACS effectively reduces DNA-fragmentation [25–27], yielding spermatozoa with higher DNA integrity, meaning higher quality for ART. The technique is frequently suggested to couples with more than two ICSI failures/miscarriages with an unknown female cause with higher DNA-fragmentation by the male partner, though its

application lacks any high level evidence, therefore its application should be consulted individually with each couple [22].



**Figure 1.** Operating principle of magnetic separation.

Since the quality of the current evidence is very low, the true clinical effects of the method on ART outcomes are still a debate and large randomized controlled studies are missing. MACS is usually not examined individually, rather combined with other techniques (mostly with SU and DGC). A Cochrane review by Lepine et al. in 2019, was inconclusive if MACS elevates clinical pregnancy and live birth rates (LBR), and reduces miscarriage rates [28]. Mei et al. in 2022 reported no significant differences in clinical pregnancy and implantation rates of the first embryo transfer cycles after MACS + SU + DGC. However, they detected a tendency to improve the LBR of the first embryo transfer cycle and the cumulative LBR along with lower number of transferred embryos and transferred number in 86 patients undergoing in vitro fertilization (IVF) and ICSI without any difference in clinical and embryological characteristics [29].

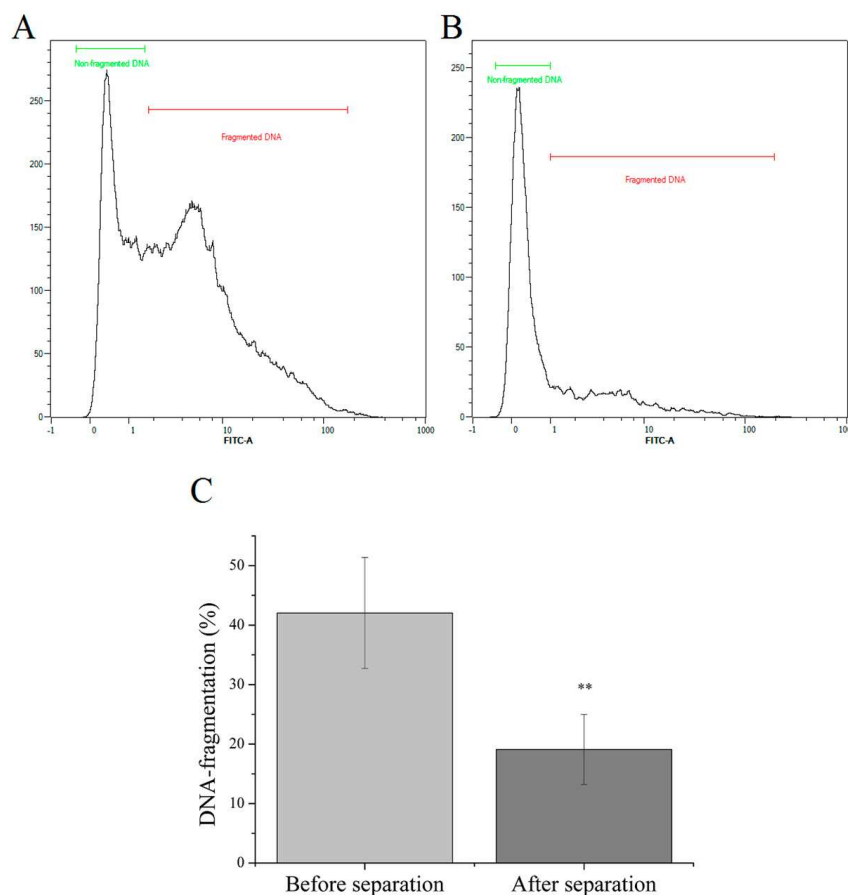
The routine application of MACS run out in the annexin V-based technique, but according to us, it hides much greater potential. Antibodies targeting different surface molecules can be attached to the microbeads and this way, we could purify the sperm/TESE sample from the contaminating cells (e.g., leukocytes, erythrocytes, epithelial cells) (Figure 1) preventing their detrimental effects (increasing ROS level, hampered visualization of spermatozoa in suspension, etc.).

## 2. Results

### 2.1. Magnetic Separation of Sperm Cells with High DNA-fragmentation

As the inclusion criteria was a high DNA-fragmentation index, the DNA-fragmentation of sperm cells before separation was  $42.04 \pm 9.34\%$ . After separation, a 2.19-fold decrement was observed, from  $42.04 \pm 9.34\%$  to  $19.11 \pm 5.90\%$  ( $p < 1\%$ , Figure 2).

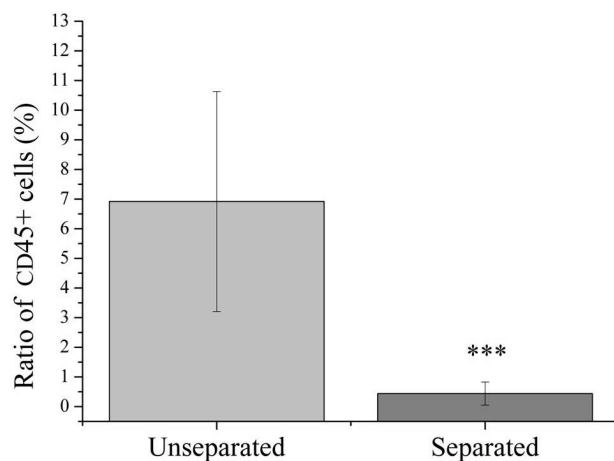




**Figure 2.** Illustrative effect of annexin V labeling and separation on sperm DNA-fragmentation. DNA-fragmentation before (A) and after (B) annexin V magnetic separation. (C) DNA-fragmentation indexes before and after magnetic separation of annexin V-positive sperm cells. \*\*  $p < 1\%$ ,  $p$  value was calculated via one sample  $t$ -test.

### 2.2. Magnetic Separation of Leukocytes

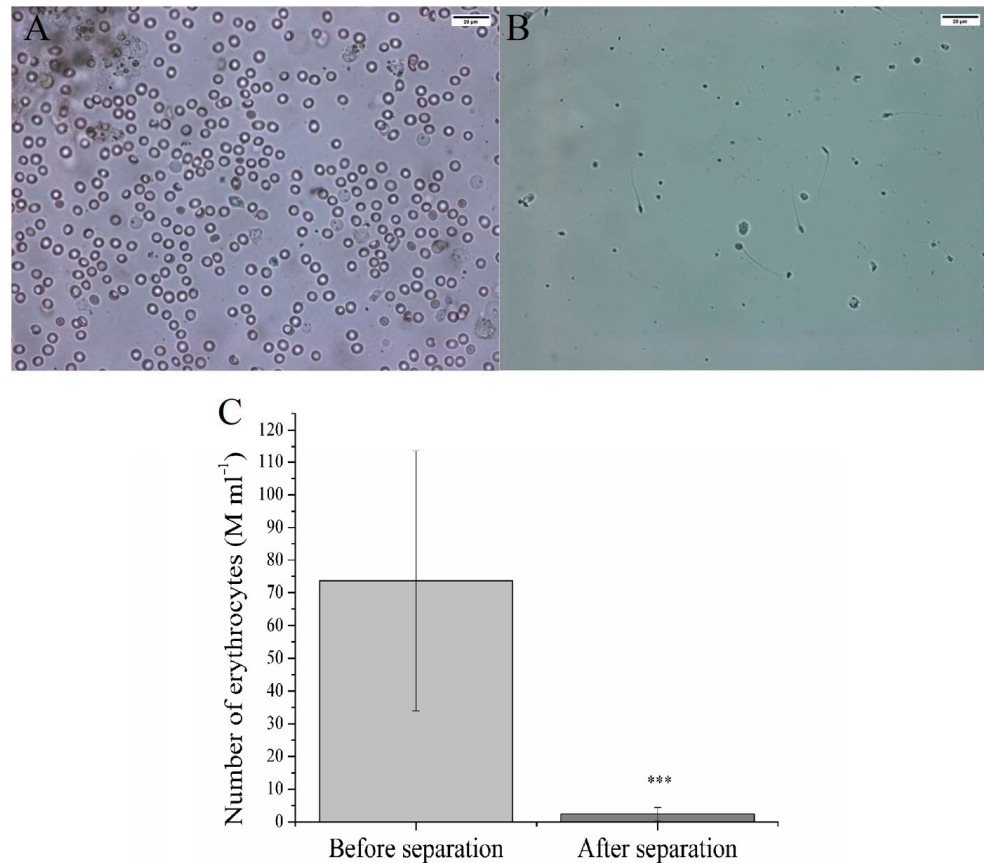
In case of leukocytospermia (LCS), the initial proportion of CD45+ leukocytes was  $6.92 \pm 3.71\%$  compared to the total number of cells in examined semen samples (Figure 3). After magnetic separation, the ratio of leukocytes has decreased significantly ( $p < 0.1\%$ ) to  $0.44 \pm 0.39\%$ .



**Figure 3.** Ratio of CD45+ cells before and after magnetic separation. \*\*\*  $p < 0.1\%$ ,  $p$  value was calculated via one sample  $t$ -test.

### 2.3. Magnetic Separation of Erythrocytes

All testicular biopsies involve some level of bleeding, which also appears in the prepared sample. The processed biopsies contained an average of  $73.71 \pm 39.85 \text{ M mL}^{-1}$  erythrocytes (Figure 4). Magnetic separation of CD235a+ cells reduced noticeably the number of CD235a expressing erythrocytes from  $73.71 \pm 39.85 \text{ M mL}^{-1}$  to  $2.39 \pm 2.04 \text{ M mL}^{-1}$  ( $p < 0.1\%$ , Figure 4).



**Figure 4.** Illustrative number of erythrocytes at a testicular biopsy before (A) and after (B) magnetic separation of CD235a+ cells. (C) Number of erythrocytes before and after magnetic separation. \*\*\*  $p < 0.1\%$ ,  $p$  value was calculated via one sample  $t$ -test.

### 3. Discussion

In our study, potential applications of the MACS technology were investigated. The original concept of the method is the elimination of apoptotic cells marked with annexin V, which we have successfully proven by confirming the data in the literature. After that, DNA-fragmentation is one of the inherent processes of apoptosis, so the effectiveness of magnetic separation can be measured through this. Annexin V magnetic separation of samples with elevated DNA-fragmentation resulted in a 2.19-fold decrease ( $p < 1\%$ ) in the DNA-fragmentation index (Figure 2). El Fekih et al. [30] observed a similar phenomenon, after annexin V magnetic separation, the ratio of un-fragmented, chromosomally balanced was significantly higher. These have been confirmed several times in the literature [31,32]. Esbert et al. [33] compared the apoptotic cells remaining on the separation column with the flow-through, high-quality cells and found that the rate of abnormalities was higher for each of the 17 chromosomes examined in the sample retained on the column. However, so far the results are not conclusive regarding the effect of the method on the effectiveness of IVF cycles. In some cases, they were not found any improvement on the reproductive outcomes [34].

The ejaculate basically consists of two main fractions: the spermatozoa and the seminal plasma composed of the secretions of the accessory glands (epididymides, seminal vesicles, prostate, bulbourethral glands). The semen sample ideal for ART purposes contains no leukocytes, erythrocytes or epithelial cell. On the contrary, leukocytes are present throughout the male genital tract and have important roles in the homeostasis (e.g., phagocytic clearance of abnormal or senescent spermatozoa by epididymal macrophages) [35]. In the clinical practice almost every semen sample is contaminated with leukocytes (mainly polymorphonuclear (PMN) cells (50–60%) [36]) in a different level. According to the WHO, only if their level exceeds  $1.0 \times 10^6$  peroxidase-positive cells  $\text{mL}^{-1}$ , it has clinical significance and is considered abnormal [37]. Prevalence of leukocytospermia (LCS) or pyospermia is around 10 to 20% of infertile men [36].

In literature, a potential relationship between LCS and poorer semen quality, consequently male sub-/infertility can be found. Leukocyte infiltration can occur due to conditions with elevated cytokine levels (e.g., varicocele, smoking) [38,39] or male-accessory gland infections (MAGI; orchitis, epididymitis, prostatitis). Specific pathomechanisms and alterations in sperm parameters can be hardly correlated with particular leukocyte subpopulations, but some of them has been already observed. PMN cells activated by cytokines exhibit ROS production causing oxidative stress [40]. If the oxidative effects overwhelms the capacity of the antioxidants system of seminal plasma, lipid peroxidation, loss a membrane integrity and as a consequence, mitochondrial DNA damage and nuclear DNA-fragmentation develops in the spermatozoa [41], in addition to the deterioration of classical semen parameters (volume, concentration, progressive/total motility) and inhibition of sperm-oocyte fusion [42–45]. T-lymphocytes giving a much smaller fraction (2–5%) of seminal leukocytes can have a negative effect on sperm motility mediated by interferon- $\gamma$  [46].

Haemospermia means blood appearing in the ejaculate. It can be a consequence of several pathological conditions (infections, urogenital malignancies, prostatic or vesicular cysts, etc.), though 30–70% is idiopathic [37,47]. In case of testicular sperm retrieval (TESE), the gained tissue sample contains not only the spermatozoa from the tubules, but many cells of other origin (leukocytes, erythrocytes, epithelial cells).

In both cases, the biological sample from the male partner, which we intend to use for ART, is contaminated with erythrocytes exerting potential unfavourable effects on spermatozoa. In such cases, where only a few spermatozoa are present in the sample (even immotile in case of testicular sperm), the abundant erythrocytes can make sperm isolation extremely difficult and time-consuming. To facilitate this, several methods have been already developed (erythrocyte-lysing buffer, pentoxifylline to stimulate sperm motility), but some concerns have been raised about the safety of their application and it is still a debate [48–51]. Cryopreservation of sperm for later use is a common practice in fertility centers, therefore another important aspect worth to consider is the harmful effect of erythrocytes on frozed-thawed spermatozoa through hemolysis (combined oxidative and cytotoxic effect of released heme and iron molecules) [52].

Cluster of differentiation (CD) is an identification system established in 1982 [53] based on the so-called clusters of similar cellular surface antigens recognized by antibodies which gives the possibility of identify cell subpopulations based on their immunophenotype. Currently, more than 400 proteins have been designated as CD markers [54]. CD45 also known as the leukocyte common antigen, is a membrane glycoprotein with a genetically highly conserved structure expressed on the surface of all nucleated haematopoietic cells, thus the only exceptions are mature erythrocytes and platelets. It has a key role in the regulation of immune response [55]. CD235a marks the transmembrane glycoprotein glyophorin A (GPA), its presence is restricted to erythrocytes and their precursors. It is responsible for the shape of red blood cells [56].

The modification of the original annexin V-based method using microbeads coated with anti-CD45 or anti-CD235a gives the opportunity not only to enrich the target cells

(spermatozoa), but to eliminate the undesired cells (leukocytes, erythrocytes) from the sample (ejaculate, testicular tissue).

Thinking further about the basic principle of MACS separation, we investigated other possible uses, such as the separation of leukocytes and erythrocytes. Previously, the removal of contaminating leukocytes from semen samples using MACS was already examined in a few studies [57–59]. Ochsendorf et al. used anti-CD67 coated microbeads as well, which bind specifically to granulocytes, the most frequent subgroup of leukocyte in semen with supreme role in ROS production. The limitation of the method could be the activation of leukocytes via binding to the antibody leading to ROS release. In the study of Marietta et al. [60], CD45 magnetic beads were applied to isolate and identify different leukocyte populations in human semen successfully. Similarly to the literature, the application of CD45 magnetic beads on semen samples of patient suffering in LCS resulted in significant decrement in the ratio of CD45+ cells, in comparison with unseparated controls (Figure 4). In this way, the method can contribute to the elimination of the aforementioned negative effects in vitro. However, it has to be mentioned that the effect of leukocytes on spermatozoa in vitro may be less severe than in vivo. Adams et al. [61] described and validated a multitarget MACS method which combines microfluidics with magnetic separation on a chip-based platform providing highly selective separation of bacterial cells based on multiple surface marker. In the future, the development of a device for sperm separation based on this technology could make possible both the purification of semen sample from contaminating cells and isolation of high-quality spermatozoa in a single step process. The main advantages of MACS are its high selectivity for target cells based on immunomagnetic principle, specificity (based on good contrast between target and non-target cells), ability to control accurately the strength of the magnetic field to optimize it for the specific cell type (e.g., sperm) and integrability with other separation methods. Furthermore, it is easy-to-use, the contribution of a highly trained operator is not necessary. The main challenge using the method is the detachment of the target cells from the magnetic beads without detrimental effects on their functions and viability. It can be achieved via saturated protein solutions, enzymes, temperature/pH/electricity change/light-induced release, aptamers, hydrogels [62]. The most apparent approach to bridge this problem would be the selection of all non-target cells (negative selection), but in a clinical setting this might be also challenging considering the high variety of contaminating cells in biological samples.

There are several options available for sorting different types of cells, but basically two methods are widely used, fluorescent-activated cell sorting (FACS) and MACS. Compared to MACS, FACS sorters are more powerful and can be used to produce more pure cell populations. An additional advantage is that it allows the separation of cells according to their surface markers, as well as their size and granularity. For the purification of rare populations, multi-color staining is also possible with some instruments. It follows from all of this that FACS sorters require special skills and represent a serious financial investment for certain laboratories. Unlike FACS, available commercial MACS instruments are less sophisticated, more compact, and much less expensive. There are many benchtop magnetic cell sorters, either manual or automated. A trained technician is not required for their use, the cell sorting process is much simpler and more time-saving [63]. The above-mentioned advantages may allow MACS to spread widely in IVF laboratories, whether it is for the separation of apoptotic sperm cells, aimed at reducing DNA-fragmentation, or the selection of other components of the semen sample.

Our literature review cannot find any previous publication about the elimination of erythrocyte in semen with MACS, thus we are the first to give a description of this setting. Regarding the obstetric and perinatal outcomes, the method seems to be safe [64], but further studies are needed focusing on the potential effects of magnetic force on spermatozoa and its aftermath on ART outcomes. This is the first time, that significant ( $p < 0.1\%$ ), 30.8-fold reduction in the number of erythrocytes has been published in TESE samples with magnetic, CD235a separation.

We do not claim that annexin V, CD45 or CD235a magnetic separations will bring a breakthrough in the field of IVF or increase dramatically its success. Nevertheless, the method may be worth rethinking. It would be important to identify a molecule on spermatozoa that allows for positive/negative selections for the development of new magnetic beads.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Sample Collections

After 3 days of abstinence, semen samples were collected by masturbation. After liquification on 37 °C (not more than 1 h), semen analyses were performed by an SCA SCOPE (Microptic S.L., Barcelona, Spain) automatic semen analysis system and a MACSQuant Analyzer 16 flow cytometer (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). In our clinic, complete sperm analysis (sperm count, motility, progressive motility, vitality, DNA-fragmentation, count of round cells and peroxidase-positive cells) is performed on all men applying for an andrological examination.

If high DNA-fragmentation index (>30%) was found during the routine examination ( $n = 17$ ), annexin V labeling and magnetic separation was performed for research purposes. Inclusion criteria were the high DNA-fragmentation index and signed research consent form.

If LCS was found during the routine examination ( $n = 13$ ), magnetic separation was performed for research purposes. Inclusion criteria were confirmed LCS and signed research consent form.

In case of testicular biopsies, testicular tissues ( $n = 12$ ) were processed mechanically. Unprocessed tissue scraps were eliminated by density gradient centrifugation. After centrifugation, sediments were used for magnetic separations. Inclusion criteria were confirmed sperm hit in the biopsy and signed research consent form.

### 4.2. Magnetic Separation of Apoptotic Sperm Cells for Decreasing DNA-Fragmentation

Separations were carried out based on the recommendations of the manufacturer. Namely, after the determination of cell count,  $1-2 \times 10^7$  sperm  $\text{mL}^{-1}$  was sedimented by density gradient centrifugation carried out at  $300 \times g$  for 12 min. For density gradient centrifugation, sperm samples were processed using 40% and 80% PureCeption™ (PureCeption™ is a sterile colloidal suspension of silica particles stabilized with covalently bound hydrophilic silane formulated in HEPES-buffered human tubal fluid) gradient layers. Briefly, 1 mL of the lower phase gradient (80%) was moved into a conical bottom tube. A second 1 mL layer of upper phase (40%) was then slowly placed over the lower phase. PureCeption™ was diluted with sperm preparation medium. A proper volume of liquefied semen was gently placed over of the upper phase. The prepared tube was then centrifuged as described above. The supernatant was discarded, cells were resuspended in MACS ART binding buffer and centrifugated at  $300 \times g$  for 4 min. The supernatant was discarded, 200  $\mu\text{L}$  of MACS ART annexin V reagent was added to cells and the final volume was completed to 500  $\mu\text{L}$  with the MACS ART binding buffer. This solution was incubated for 15 min at room temperature. A MACS ART MS separator column was rinsed with MACS ART binding buffer and the labeled cells were loaded onto the column. Unlabeled cells that passed through were collected. Sperm DNA-fragmentation measurement with TUNEL assay was done before and after separations based on the method of Sharma et al. [65] DNA-fragmentation index was calculated by dividing the TUNEL-positive sperm count by the total number of sperm cells.

### 4.3. Magnetic Separation of Leukocytes

Separations were carried out based on the recommendations of the manufacturer. Namely, semen samples were centrifuged at  $300 \times g$  for 10 min, the plasmas were discarded and the cell pellets were resuspended in 80  $\mu\text{L}$  of buffer (PBS, containing 0.5% bovine serum albumin and 2 mM EDTA, pH 7.2) per  $10^7$  total cells. 20  $\mu\text{L}$  of CD45 (clone REA747)

magnetic microbeads were added to the samples per  $10^7$  total cells. After mixing, this solution was incubated for 15 min on room temperature (the manufacturer recommends 4–8 °C but for spermatozoa it is not an optimal temperature). After the incubation, 2 mL of PBS was added and a centrifugation was performed as described earlier. The supernatant was aspirated completely and up to  $10^8$  cells were resuspended in 500  $\mu$ L of PBS. LS separator columns were rinsed with PBS and the labelled cell suspensions were loaded onto the columns. Unlabelled cells that passed through were collected. The unlabelled cell fraction was labeled with CD45-FITC stain to ensure complete removal of CD45+ cells. Flow cytometric analyses were performed. Ratios of CD45+ cells were determined before and after magnetic separations.

#### 4.4. Magnetic Separation of Erythrocytes

Separations were carried out based on the recommendations of the manufacturer. Namely, prepared testicular biopsies were centrifuged at  $300\times g$  for 10 min, the supernatants were discarded and the cell pellets were resuspended in 80  $\mu$ L of PBS buffer (the composition is the same as described above) per  $10^7$  total cells. 20  $\mu$ L of CD235a (clone REA175) magnetic microbeads were added to the samples per  $10^7$  total cells. After mixing, this solution was incubated for 15 min on room temperature. After the incubation, 2 mL of PBS was added and centrifugation was performed as described earlier. The supernatant was aspirated completely and up to  $10^8$  cells were resuspended in 500  $\mu$ L of PBS. LS separator columns were rinsed with PBS and the labelled cell suspensions were loaded onto the columns. Unlabelled cells that passed through were collected. Number of erythrocytes before and after magnetic separation was observed and counted with light microscopy. Erythrocytes were identified based on their colour and morphological features.

#### 4.5. Chemicals

For magnetic separations, annexin V, CD45 and CD235a magnetic beads; and for fluorescent labeling, CD45-FITC fluorophore were purchased from Miltenyi Biotec. For buffer preparation, chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). TUNEL assay for DNA-fragmentation determination was from Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For density gradient centrifugations, PureCeption™ and sperm preparation medium were purchased from Origio, CooperSurgical (CooperSurgical, Trumbull, CT, USA).

#### 4.6. Statistical Analysis

The data were given as the average and standard deviation. A Shapiro–Wilks test was used to evaluate the distribution of the data. Normally distributed variables were examined using the parametric one sample *t*-test. GraphPad in Stat 7.0 software (Dotmatics, GraphPad Software Inc., Boston, MA, USA) was used for statistical analysis.

## 5. Conclusions

MACS is classically used in the annexin V-based setting resulting the isolation of a higher quality sperm subpopulation by negative selection, which means the active extraction of apoptotic spermatozoa from the sample. Substituting annexin V with various molecules (mostly antibodies), we can target undesired cells of other origin as well.

In our study, we showed that with the application of CD45 magnetic beads the ratio of CD45+ leukocyte in semen samples can be significantly decreased, which could be useful when working with leukocytospermic samples. We proved that with using CD235a beads, testicular samples can be purified from contaminating erythrocytes, decreasing their concentration significantly in the sample. This method can give aid during processing TESE samples, handling haemospermic ejaculates or as a preparative measure before cryopreservation.

To find a molecule characteristic to the highest quality spermatozoa applicable in MACS could be the direction of future investigations. State of the art mass spectrometry

(MS) can reveal novel biochemical factors, thus can be a valuable tool of such research. However, the MS technique is expensive and difficult to use in clinical environment. In future developments and routine diagnostic applications, a molecular biomarker or biomarker panels can be immobilized to MACS beads to create new predictive sperm viability tests. In our opinion, this routine positive discrimination procedure can be used to select the most suitable sperm for fertilisation and thus increase the efficiency of the IVF procedure.

**Author Contributions:** P.C.: Performing experiments, manuscript writing, final approval of the version to be submitted. A.B., L.M., A.T. and Á.S.: Manuscript writing, final approval of the version to be submitted. G.M.: Study design, performing experiments, figure preparation, manuscript writing, final approval of the version to be submitted. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the RRF-2.3.1-21-2022-00012 “National Laboratory on Human Reproduction” program, University of Pécs, funded by the Hungarian Government.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Regional Committee for Research Ethics, University of Pécs (8754-PTE/2021).

**Informed Consent Statement:** Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article.

**Acknowledgments:** Project no. RRF-2.3.1-21-2022-00012, titled National Laboratory on Human Reproduction has been implemented with the support provided by the Recovery and Resilience Facility of the European Union within the framework of Program Széchenyi Plan Plus.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Cox, C.M.; Thoma, M.E.; Tchangelova, N.; Mburu, G.; Bornstein, M.J.; Johnson, C.L.; Kiarie, J. Infertility Prevalence and the Methods of Estimation from 1990 to 2021: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum. Reprod. Open* **2022**, *2022*, hoac051. [CrossRef] [PubMed]
2. Kamel, R.M. Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. *J. Reprod. Infertil.* **2013**, *14*, 96–109. [CrossRef] [PubMed]
3. Centers for Disease Control and Prevention. *2021 Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic and National Summary Report*; US Dept of Health and Human Services: Washington, DC, USA, 2023.
4. Winters, B.R.; Walsh, T.J. The Epidemiology of Male Infertility. *Urol. Clin. N. Am.* **2014**, *41*, 195–204. [CrossRef] [PubMed]
5. Suarez, S.S.; Pacey, A.A. Sperm Transport in the Female Reproductive Tract. *Hum. Reprod. Update* **2006**, *12*, 23–37. [CrossRef]
6. Sánchez-Calabuig, M.J.; López-Cardona, A.P.; Fernández-González, R.; Ramos-Ibeas, P.; Fonseca Balvís, N.; Laguna-Barraza, R.; Pericuesta, E.; Gutiérrez-Adán, A.; Bermejo-Álvarez, P. Potential Health Risks Associated to ICSI: Insights from Animal Models and Strategies for a Safe Procedure. *Front. Public Health* **2014**, *2*, 241. [CrossRef]
7. Pinto, S.; Carrageta, D.F.; Alves, M.G.; Rocha, A.; Agarwal, A.; Barros, A.; Oliveira, P.F. Sperm Selection Strategies and Their Impact on Assisted Reproductive Technology Outcomes. *Andrologia* **2021**, *53*, e13725. [CrossRef]
8. McDowell, S.; Kroon, B.; Ford, E.; Hook, Y.; Glujovsky, D.; Yazdani, A. Advanced Sperm Selection Techniques for Assisted Reproduction. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, CD010461. [CrossRef]
9. Oseguera-López, I.; Ruiz-Díaz, S.; Ramos-Ibeas, P.; Pérez-Cerezales, S. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 298. [CrossRef]
10. Pesce, M.; De Felici, M. Purification of Mouse Primordial Germ Cells by MiniMACS Magnetic Separation System. *Dev. Biol.* **1995**, *170*, 722–725. [CrossRef]
11. Govers, C.; Berrevoets, C.; Treffers-Westerlaken, E.; Broertjes, M.; Debets, R. Magnetic-Activated Cell Sorting of TCR-Engineered T Cells, Using TCD34 as a Gene Marker, but Not Peptide-MHC Multimers, Results in Significant Numbers of Functional CD4+ and CD8+ T Cells. *Hum. Gene Ther. Methods* **2012**, *23*, 213–224. [CrossRef]
12. Ravelo, K.M.; Andersen, N.D.; Monje, P. V Magnetic-Activated Cell Sorting for the Fast and Efficient Separation of Human and Rodent Schwann Cells from Mixed Cell Populations. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1739*, 87–109. [CrossRef]

13. Weil, M.-T.; Schulz-Éberlin, G.; Mukherjee, C.; Kuo-Elsner, W.P.; Schäfer, I.; Müller, C.; Simons, M. Isolation and Culture of Oligodendrocytes. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1936*, 79–95. [CrossRef]
14. Zhang, H.; Yang, S.; Chen, M.; Tian, D.-S.; Qin, C. Isolation of Mouse Primary Microglia by Magnetic-Activated Cell Sorting in Animal Models of Demyelination. *J. Vis. Exp.* **2022**, *182*, e63511. [CrossRef]
15. Frauchiger, D.A.; Tekari, A.; May, R.D.; Džafko, E.; Chan, S.C.W.; Stoyanov, J.; Bertolo, A.; Zhang, X.; Guerrero, J.; Sakai, D.; et al. Fluorescence-Activated Cell Sorting Is More Potent to Fish Intervertebral Disk Progenitor Cells Than Magnetic and Beads-Based Methods. *Tissue Eng. Part C. Methods* **2019**, *25*, 571–580. [CrossRef]
16. Tsujisaka, Y.; Hatani, T.; Okubo, C.; Ito, R.; Kimura, A.; Narita, M.; Chonabayashi, K.; Funakoshi, S.; Lucena-Cacace, A.; Toyoda, T.; et al. Purification of Human iPSC-Derived Cells at Large Scale Using MicroRNA Switch and Magnetic-Activated Cell Sorting. *Stem Cell Rep.* **2022**, *17*, 1772–1785. [CrossRef] [PubMed]
17. Dunlap, D.G.; Yang, L.; Qin, S.; Li, K.; Fitch, A.; Huang, L.; McVerry, B.J.; Hand, T.W.; Methé, B.A.; Morris, A. Magnetic-Activated Cell Sorting Identifies a Unique Lung Microbiome Community. *Microbiome* **2023**, *11*, 117. [CrossRef] [PubMed]
18. Armstrong, H.; Alipour, M.; Valcheva, R.; Bording-Jorgensen, M.; Jovel, J.; Zaidi, D.; Shah, P.; Lou, Y.; Ebeling, C.; Mason, A.L.; et al. Host Immunoglobulin G Selectively Identifies Pathobionts in Pediatric Inflammatory Bowel Diseases. *Microbiome* **2019**, *7*, 1. [CrossRef] [PubMed]
19. Shamloo, A.; Yazdani, A.; Saghafifar, F. Investigation of a Two-Step Device Implementing Magnetophoresis and Dielectrophoresis for Separation of Circulating Tumor Cells from Blood Cells. *Eng. Life Sci.* **2020**, *20*, 296–304. [CrossRef] [PubMed]
20. Grunewald, S.; Paasch, U.; Glander, H.J. Enrichment of Non-Apoptotic Human Spermatozoa after Cryopreservation by Immunomagnetic Cell Sorting. *Cell Tissue Bank.* **2001**, *2*, 127–133. [CrossRef] [PubMed]
21. Fadok, V.A.; Voelker, D.R.; Campbell, P.A.; Cohen, J.J.; Bratton, D.L.; Henson, P.M. Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 2207–2216. [CrossRef] [PubMed]
22. Garrido, N.; Gil Juliá, M. The Use of Non-Apoptotic Sperm Selected by Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) to Enhance Reproductive Outcomes: What the Evidence Says. *Biology* **2024**, *13*, 30. [CrossRef]
23. Hichri, R.; Amor, H.; Khammari, M.; Harzallah, M.; El Fekih, S.; Saad, A.; Ajina, M.; Ben Ali, H. Apoptotic Sperm Biomarkers and the Correlation between Conventional Sperm Parameters and Clinical Characteristics. *Andrologia* **2018**, *50*, e12813. [CrossRef]
24. Said, T.M.; Agarwal, A.; Grunewald, S.; Rasch, M.; Glander, H.-J.; Paasch, U. Evaluation of Sperm Recovery Following Annexin V Magnetic-Activated Cell Sorting Separation. *Reprod. Biomed. Online* **2006**, *13*, 336–339. [CrossRef]
25. Said, T.; Agarwal, A.; Grunewald, S.; Rasch, M.; Baumann, T.; Kriegel, C.; Li, L.; Glander, H.-J.; Thomas, A.J.J.; Paasch, U. Selection of Nonapoptotic Spermatozoa as a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An in Vitro Model. *Biol. Reprod.* **2006**, *74*, 530–537. [CrossRef] [PubMed]
26. Lee, T.-H.; Liu, C.-H.; Shih, Y.-T.; Tsao, H.-M.; Huang, C.-C.; Chen, H.-H.; Lee, M.-S. Magnetic-Activated Cell Sorting for Sperm Preparation Reduces Spermatozoa with Apoptotic Markers and Improves the Acrosome Reaction in Couples with Unexplained Infertility. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 839–846. [CrossRef] [PubMed]
27. Zahedi, A.; Tavalaei, M.; Deemeh, M.R.; Azadi, L.; Fazilati, M.; Nasr-Esfahani, M.H. Zeta Potential vs Apoptotic Marker: Which Is More Suitable for ICSI Sperm Selection? *J. Assist. Reprod. Genet.* **2013**, *30*, 1181–1186. [CrossRef] [PubMed]
28. Lepine, S.; McDowell, S.; Searle, L.M.; Kroon, B.; Glujovsky, D.; Yazdani, A. Advanced Sperm Selection Techniques for Assisted Reproduction. *Cochrane database Syst. Rev.* **2019**, *7*, CD010461. [CrossRef] [PubMed]
29. Mei, J.; Chen, L.-J.; Zhu, X.-X.; Yu, W.; Gao, Q.-Q.; Sun, H.-X.; Ding, L.-J.; Wang, J.-X. Magnetic-Activated Cell Sorting of Nonapoptotic Spermatozoa with a High DNA Fragmentation Index Improves the Live Birth Rate and Decreases Transfer Cycles of IVF/ICSI. *Asian J. Androl.* **2022**, *24*, 367–372. [CrossRef] [PubMed]
30. El Fekih, S.; Tous, C.; Gueganic, N.; Brugnion, F.; Ben Ali, H.; Bujan, L.; Moinard, N.; Caire-Tetauru, E.; Ajina, M.; Douet-Guilbert, N.; et al. Decrease of Spermatozoa with an Unbalanced Chromosome Content after Cell Sorting in Men Carrying a Structural Chromosomal Abnormality. *Andrology* **2020**, *8*, 181–190. [CrossRef]
31. Aziz, N.; Said, T.; Paasch, U.; Agarwal, A. The Relationship between Human Sperm Apoptosis, Morphology and the Sperm Deformity Index. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 1413–1419. [CrossRef]
32. de Vantéry Arrighi, C.; Lucas, H.; Chardonens, D.; de Agostini, A. Removal of Spermatozoa with Externalized Phosphatidylserine from Sperm Preparation in Human Assisted Medical Procreation: Effects on Viability, Motility and Mitochondrial Membrane Potential. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2009**, *7*, 1. [CrossRef]
33. Esbert, M.; Godo, A.; Soares, S.R.; Florensa, M.; Amorós, D.; Ballesteros, A.; Vidal, F. Spermatozoa with Numerical Chromosomal Abnormalities Are More Prone to Be Retained by Annexin V-MACS Columns. *Andrology* **2017**, *5*, 807–813. [CrossRef]
34. Romany, L.; Garrido, N.; Motato, Y.; Aparicio, B.; Remohí, J.; Meseguer, M. Removal of Annexin V-Positive Sperm Cells for Intracytoplasmic Sperm Injection in Ovum Donation Cycles Does Not Improve Reproductive Outcome: A Controlled and Randomized Trial in Unselected Males. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 1567–1575.e1. [CrossRef]
35. Khodamoradi, K.; Kuchakulla, M.; Narasimman, M.; Khosravizadeh, Z.; Ali, A.; Brackett, N.; Ibrahim, E.; Ramasamy, R. Laboratory and Clinical Management of Leukocytospermia and Hematospermia: A Review. *Ther. Adv. Reprod. Health* **2020**, *14*, 2633494120922511. [CrossRef]
36. Wolff, H. The Biologic Significance of White Blood Cells in Semen. *Fertil. Steril.* **1995**, *63*, 1143–1157. [CrossRef]




37. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 6th ed.; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2021.
38. Mongioi, L.M.; Alamo, A.; Calogero, A.E.; Compagnone, M.; Giacone, F.; Cannarella, R.; La Vignera, S.; Condorelli, R.A. Evaluation of Seminal Fluid Leukocyte Subpopulations in Patients with Varicocele. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2020**, *34*, 2058738420925719. [CrossRef] [PubMed]
39. Close, C.E.; Roberts, P.L.; Berger, R.E. Cigarettes, Alcohol and Marijuana Are Related to Pyospermia in Infertile Men. *J. Urol.* **1990**, *144*, 900–903. [CrossRef] [PubMed]
40. Saleh, R.A.; Agarwal, A.; Kandirali, E.; Sharma, R.K.; Thomas, A.J.; Nada, E.A.; Evenson, D.P.; Alvarez, J.G. Leukocytospermia Is Associated with Increased Reactive Oxygen Species Production by Human Spermatozoa. *Fertil. Steril.* **2002**, *78*, 1215–1224. [CrossRef] [PubMed]
41. Derbel, R.; Sellami, H.; Sakka, R.; Ben Slima, A.; Mkaddem, I.; Gdoura, R.; Mcelreavey, E.; Ammar-Keskes, L. Relationship between Nuclear DNA Fragmentation, Mitochondrial DNA Damage and Standard Sperm Parameters in Spermatozoa of Infertile Patients with Leukocytospermia. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **2021**, *50*, 102101. [CrossRef] [PubMed]
42. Fan, S.; Zhao, Y.; Zhang, Z.; Wang, H.; Hou, Y.; Bai, S.; Liu, R.; Xu, B. Effect of Leukocytes on Semen Quality in Men from Primary and Secondary Infertile Couples: A Cross-Sectional Study. *Health Sci. Rep.* **2023**, *6*, e1683. [CrossRef]
43. Fraczek, M.; Hryhorowicz, M.; Gill, K.; Zarzycka, M.; Gaczarzewicz, D.; Jedrzejczak, P.; Bilinska, B.; Piasecka, M.; Kurpisz, M. The Effect of Bacteriospermia and Leukocytospermia on Conventional and Nonconventional Semen Parameters in Healthy Young Normozoospermic Males. *J. Reprod. Immunol.* **2016**, *118*, 18–27. [CrossRef]
44. Plante, M.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. Reactive Oxygen Species Released by Activated Neutrophils, but Not by Deficient Spermatozoa, Are Sufficient to Affect Normal Sperm Motility. *Fertil. Steril.* **1994**, *62*, 387–393. [CrossRef]
45. Aitken, R.J.; West, K.; Buckingham, D. Leukocytic Infiltration into the Human Ejaculate and Its Association with Semen Quality, Oxidative Stress, and Sperm Function. *J. Androl.* **1994**, *15*, 343–352. [CrossRef] [PubMed]
46. Fedder, J.; Ellerman-Eriksen, S. Effect of Cytokines on Sperm Motility and Ionophore-Stimulated Acrosome Reaction. *Arch. Androl.* **1995**, *35*, 173–185. [CrossRef] [PubMed]
47. Mathers, M.J.; Degener, S.; Sperling, H.; Roth, S. Hematospermia—A Symptom with Many Possible Causes. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2017**, *114*, 186–191. [CrossRef] [PubMed]
48. Soygur, B.; Celik, S.; Celik-Ozenci, C.; Sati, L. Effect of Erythrocyte-Sperm Separation Medium on Nuclear, Acrosomal, and Membrane Maturity Parameters in Human Sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2018**, *35*, 491–501. [CrossRef]
49. Yazdinejad, F.; Heydari, L.; Motamed Zadeh, L.; Seifati, S.M.; Agha-Rahimi, A. Application of Erythrocyte Lysing Buffer (ELB) Has Detrimental Effects on Human Sperm Quality Parameters, DNA Fragmentation and Chromatin Structure. *Andrologia* **2020**, *52*, e13702. [CrossRef] [PubMed]
50. Popal, W.; Nagy, Z.P. Laboratory Processing and Intracytoplasmic Sperm Injection Using Epididymal and Testicular Spermatozoa: What Can Be Done to Improve Outcomes? *Clinics* **2013**, *68* (Suppl. S1), 125–130. [CrossRef]
51. Tournaye, H.; Wieme, P.; Janssens, R.; Verheyen, G.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A. Incubation of Spermatozoa from Asthenozoospermic Semen Samples with Pentoxifylline and 2-Deoxyadenosine: Variability in Hyperactivation and Acrosome Reaction Rates. *Hum. Reprod.* **1994**, *9*, 2038–2043. [CrossRef]
52. Rijsselaere, T.; Van Soom, A.; Maes, D.; Verberckmoes, S.; de Kruif, A. Effect of Blood Admixture on in Vitro Survival of Chilled and Frozen-Thawed Canine Spermatozoa. *Theriogenology* **2004**, *61*, 1589–1602. [CrossRef]
53. Bernard, A.; Boumsell, L. Human leukocyte differentiation antigens. *Presse Med.* **1984**, *13*, 2311–2316. [CrossRef]
54. Tian, H.-F.; Xing, J.; Tang, X.-Q.; Chi, H.; Sheng, X.-Z.; Zhan, W.-B. Cluster of Differentiation Antigens: Essential Roles in the Identification of Teleost Fish T Lymphocytes. *Mar. Life Sci. Technol.* **2022**, *4*, 303–316. [CrossRef]
55. Rheinländer, A.; Schraven, B.; Bommhardt, U. CD45 in Human Physiology and Clinical Medicine. *Immunol. Lett.* **2018**, *196*, 22–32. [CrossRef]
56. Karsten, U.; Butschak, G.; Stahn, R.; Goletz, S. A Novel Series of Anti-Human Glycophorin A (CD235a) Antibodies Defining Five Extra- and Intracellular Epitopes. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 1354–1360. [CrossRef]
57. Krausz, C.; West, K.; Buckingham, D.; Aitken, R.J. Development of a Technique for Monitoring the Contamination of Human Semen Samples with Leukocytes. *Fertil. Steril.* **1992**, *57*, 1317–1325. [CrossRef]
58. Ochsendorf, F.R.; Beschmann, H.A.; Neuhauser, S.; Milbradt, R. CD 45/67 Immunobead Preparation of Human Semen Activates Granulocytes. *Andrologia* **1997**, *29*, 193–199. [CrossRef] [PubMed]
59. Hipler, U.C.; Schreiber, G.; Wollina, U. Reactive Oxygen Species in Human Semen: Investigations and Measurements. *Arch. Androl.* **1998**, *40*, 67–78. [CrossRef] [PubMed]
60. Maietta, G.; Fiore, J.R.; Pellegrino, V.; Milillo, G.; Tagliaferro, L.; Corbelli, M.; Pastore, G. Leucocyte Identification and Analysis in Human Semen. *Arch. Androl.* **1997**, *38*, 99–105. [CrossRef] [PubMed]
61. Adams, J.D.; Kim, U.; Soh, H.T. Multitarget Magnetic Activated Cell Sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18165–18170. [CrossRef] [PubMed]
62. Plouffe, B.D.; Murthy, S.K.; Lewis, L.H. Fundamentals and Application of Magnetic Particles in Cell Isolation and Enrichment: A Review. *Rep. Prog. Phys.* **2015**, *78*, 16601. [CrossRef] [PubMed]
63. Frenea-Robin, M.; Marchalot, J. Basic Principles and Recent Advances in Magnetic Cell Separation. *Magnetochemistry* **2022**, *8*, 11. [CrossRef]

64. Gil Juliá, M.; Hervas, I.; Navarro-Gomezlechón, A.; Mossetti, L.; Quintana, F.; Amoros, D.; Pacheco, A.; Gonzalez-Ravina, C.; Rivera-Egea, R.; Garrido, N. Semen Processing Using Magnetic-Activated Cell Sorting before ICSI Is Deemed Safe for Obstetric and Perinatal Outcomes: A Retrospective Multicentre Study. *Reprod. Biomed. Online* **2023**, *47*, 103172. [CrossRef] [PubMed]
65. Sharma, R.; Ahmad, G.; Esteves, S.C.; Agarwal, A. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase DUTP Nick End Labeling (TUNEL) Assay Using Bench Top Flow Cytometer for Evaluation of Sperm DNA Fragmentation in Fertility Laboratories: Protocol, Reference Values, and Quality Control. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2016**, *33*, 291–300. [CrossRef] [PubMed]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Brief Report

# Magnetic-Activated Cell Sorting as a Method to Improve Necrozoospermia-Related Asthenozoospermic Samples

Gábor Máté<sup>1,2,3,\*</sup>, András Balló<sup>1,2,3</sup>, László Márk<sup>3,4,5</sup>, Péter Czétány<sup>2,3</sup>, Árpád Szántó<sup>2,3</sup> and Attila Török<sup>1,3</sup> 

- <sup>1</sup> Pannon Reproduction Institute, 8300 Tapolca, Hungary; ballo.andras@pte.hu (A.B.); drtoroka@t-online.hu (A.T.)  
<sup>2</sup> Urology Clinic, University of Pécs Clinical Centre, 7621 Pécs, Hungary; czetany.peter@pte.hu (P.C.); szanto.arpad@pte.hu (Á.S.)  
<sup>3</sup> National Human Reproduction Laboratory, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; laszlo.mark@aok.pte.hu  
<sup>4</sup> Department of Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Hungary  
<sup>5</sup> MTA-PTE Human Reproduction Research Group, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary  
\* Correspondence: mate.gabor@pri.hu

**Abstract:** According to some statistics, absolute asthenozoospermia affects every 1 in 5000 men. Although this incidence rate does not appear to be too high, it is extremely important to address the phenomenon because it can drastically reduce the chances of pregnancy, even with assisted reproduction. The biggest problem with absolute asthenozoospermia is that it is difficult to distinguish between live and dead sperm cells, and fertilization with non-viable spermatozoa may contribute to the failure of an assisted reproduction cycle. Nowadays, DNA fragmentation (DF) is a crucial parameter of semen analysis, and in this paper, we provide evidence of the correlation between DF and vitality. For this purpose, the main semen parameters were investigated by a CASA system (concentration, motility, progressive motility, vitality and DF). In the necrozoospermic group (vitality < 58%), all the measured parameters showed significant differences compared to normal vitality. Concentration (30.1 M mL<sup>-1</sup> vs. 13.6 M mL<sup>-1</sup>), motility (31.9% vs. 18.3%), and progressive motility (24.3% vs. 12.7%) were significantly decreased, while DF was significantly increased (17.4% vs. 23.7%). Based on the connection between vitality decrement and DF increment, DF lowering methods, such as magnetic-activated cell sorting, have been hypothesized as novel methods for the elimination of dead spermatozoa.

**Keywords:** assisted reproduction; asthenozoospermia; DNA fragmentation; in vitro fertilization; magnetic-activated cell sorting; necrozoospermia; vitality



**Citation:** 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**, *11*, 2914. <https://doi.org/10.3390/jcm11102914>

Academic Editors: Alessio Paffoni and Paola Viganò

Received: 15 April 2022

Accepted: 18 May 2022

Published: 21 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Infertility is a growing problem; it affects 10–15% of couples worldwide, and half of the cases are related to the male partner alone or coupled with the female partner. With the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique, most of these male-related problems can be compensated, whether it is oligozoospermia, teratozoospermia or asthenozoospermia. However, in the case of absolute asthenozoospermia, when no motile sperm are found in the used sample, it is very hard to distinguish between viable and dead sperms during ICSI, which reduces its success. The nature of absolute asthenozoospermia is still not fully understood, but a lot of research has been conducted in this regard. Potential triggers include metabolic deficiencies of spermatozoa, ultrastructural disorders of sperm flagellum, necrozoospermia, and it can also be idiopathic [1]. The origin of dead spermatozoa can be a result of either apoptotic or necrotic processes. A lot of dyes have been developed to determine the characteristic of these viable/apoptotic/necrotic cells, but a great disadvantage of these techniques is that they are only diagnostic methods, and the fertilization process is not improved by them.

The hypoosmotic swelling test (HOST) may be the only available technique that allows us to make correlations between the viability of cells and the integrity of their plasma membrane [2]. Besides this, a novel technique in sperm separation is magnetic-activated cell sorting (MACS), which decreases the DNA fragmentation (DF) of sperm samples. Its function is based on the fact that in apoptotic cells, the phosphatidylserine molecule is transferred from the inner surface of the plasma membrane to the outer surface, which enables it to be labelled and separated in a magnetic field using magnetically coupled annexin V [3]. MACS is generally applied to reduce DF, but our study aimed to present a lesser known ability of MACS separation, namely, how to enhance the amount of viable, but immotile, sperms in ICSI samples. For this purpose, we will demonstrate (i) the correlation between DF and sperm vitality, and (ii) the effects of MACS separation on vitality through a case study.

## 2. Materials and Methods

Semen samples were collected from 205 men who applied for sperm DF determination in the Hungarian Pannon Reproduction Institute in 2021. Samples were divided into two groups, based on the percentage of viable spermatozoa or the value of DF. In the first case, the first group contained 151 samples with sperm vitality higher than 58%, and the second group contained 54 samples with necrozoospermic values (vitality was lower than 58%) [2]. In the second case, the low DF group (<30%) had 170 samples and the high DF group (>30%) had 35 samples. Semen analysis was performed by an SCA SCOPE (Microptic S.L., Barcelona, Spain) automatic semen analysis system, and the main parameters were measured, namely, sperm vitality, DF, concentration, motility and progressive motility. Samples were collected after 3 days of sexual abstinence, and assessments were performed after liquefaction at room temperature, but not more than 60 min after ejaculation. Sperm vitality was assessed after eosin staining. One drop of semen sample (5  $\mu$ L) was mixed with equal volume of 1% eosin-Y solution, a smear was made on a glass slide, covered with a coverslip, incubated for 30 s at 37  $^{\circ}$ C, and 200 spermatozoa were evaluated. DF was assessed using the sperm chromatin dispersion (SCD) test, following the manufacturer's instructions and the WHO guidelines [2]. Briefly, semen was diluted with phosphate buffer saline to 5–10 million  $\text{mL}^{-1}$ . A 30  $\mu$ L sample was mixed with 1% agarose at 37  $^{\circ}$ C. A total of 14  $\mu$ L of the above mixture was pipetted onto a prepared agarose glass slide and covered with a glass coverslip (18  $\times$  18 mm). The slide was cooled for 5 min at 4  $^{\circ}$ C. The coverslip was removed and the glass slide was immersed horizontally into a denaturation solution (0.08 M HCl) for 7 min at room temperature. After this, the slide was transferred to a lysis buffer (0.4 M Tris, 0.4 M DTT, 50 mM EDTA, 0.3% SDS and 1% Triton Xysis) and incubated for 25 min at room temperature. The slide was thoroughly washed with distilled water, dehydrated for 2 min in each of 70, 90 and 100% ethanol and subsequently air dried. The slide was stained with Giemsa and analyzed by an SCA Scope system. During the analysis, halos around the head of sperm cells were observed. Healthy cells show extended or moderate halos, while sperms with fragmented DNA show small or no halos. A minimum of 200 spermatozoa per sample were evaluated. For SCD tests, all of the mentioned reagents were purchased from Microptic S.L as kits.

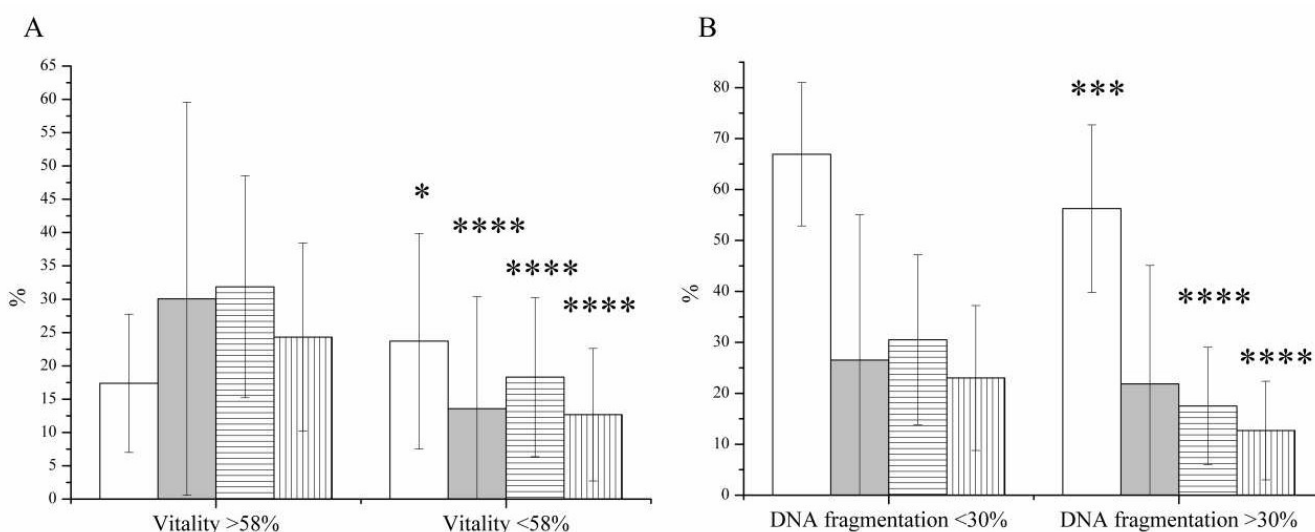
During the analysis of these 205 samples, absolute asthenozoospermia was observed in one case, and MACS separation was applied for further investigation. For MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) separation, after liquefaction, density gradient centrifugation was performed at 400 g for 12 min. The pellet was collected and washed with a binding buffer. The suspension was centrifuged at 400 g for 3 min and the supernatant was removed. Sperm cells were labelled with 100  $\mu$ L of magnetic bead-conjugated annexin V for 15 min at room temperature. A separation column containing iron balls was placed in a magnet, and the labelled cells were separated by the magnetic field, allowing the negative fraction to be collected. Annexin V-positive apoptotic sperm cells with fragmented DNA are retained by the column. Washing was

performed on the negative fraction, and the sperm cells were then analyzed. For MACS separation, all of the mentioned reagents were purchased from Miltenyi Biotec as kits. Based on the abovementioned methods, DF index and vitality were determined again after MACS separation.

Data were given as average and deviation. A Shapiro–Wilk test was used to evaluate the distribution of the data. Non-normally distributed variables were examined using the Kruskal–Wallis non-parametric test. Graphpad InStat software, version 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis.

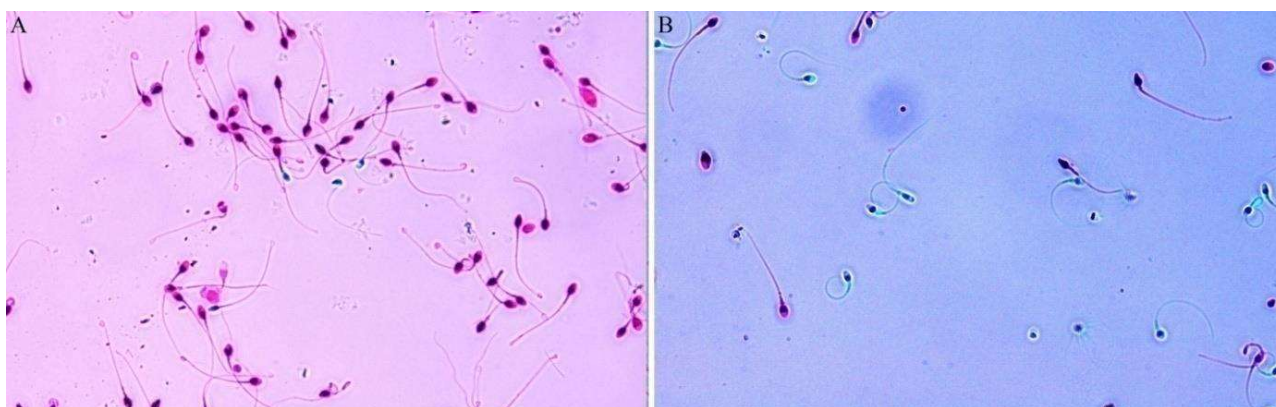
### 3. Results

Both the decrement in sperm vitality and the increment in DF resulted in significant differences (Figure 1). If our results are analyzed as a function of vitality, the DF was 1.36-fold higher in the necrozoospermic group ( $17.38 \pm 10.38\%$  vs.  $23.71 \pm 16.17\%$ ,  $p = 0.0261$ ) in comparison with normal vitality. The concentration, the motility and the progressive motility were  $30.07 \pm 29.50 \text{ M mL}^{-1}$  vs.  $13.58 \pm 16.81 \text{ M mL}^{-1}$ ,  $31.86 \pm 16.65\%$  vs.  $18.31 \pm 11.94\%$ , and  $24.31 \pm 14.11\%$  vs.  $12.67 \pm 9.95\%$ , respectively (Figure 1A). If our data are approached from the function of DF, a more significant difference can be obtained ( $p < 0.001$ ). In the low DF group, the vitality was  $66.91 \pm 14.08\%$ , and in the high DF group, this value was  $56.25 \pm 16.44\%$ . The concentration, the motility and the progressive motility were  $26.52 \pm 28.51 \text{ M mL}^{-1}$  vs.  $21.85 \pm 23.22 \text{ M mL}^{-1}$ ,  $30.51 \pm 16.67\%$  vs.  $17.51 \pm 11.53\%$ , and  $23.01 \pm 14.23\%$  vs.  $12.68 \pm 9.68\%$ , respectively (Figure 1B).

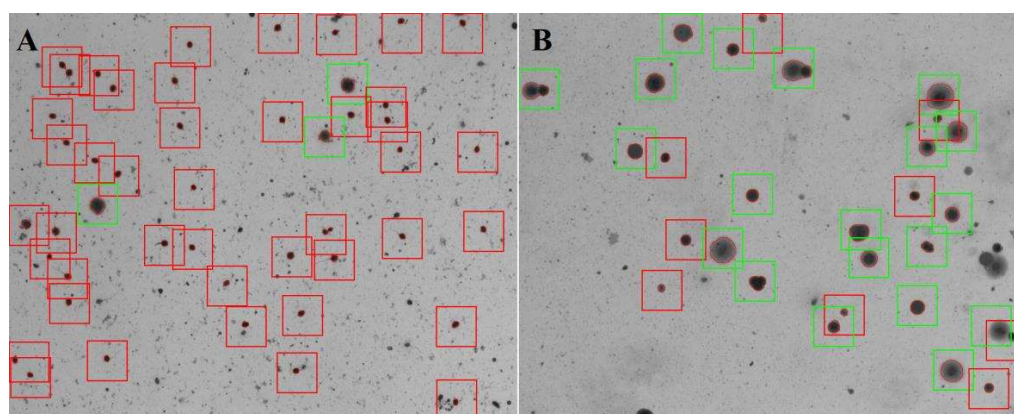


**Figure 1.** Correlation between sperm vitality and their DNA fragmentation. (A) DNA fragmentation (white column), concentration (grey column), motility (horizontally striped column) and progressive motility (vertically striped column) as a function of sperm vitality. (B) Vitality (white column), concentration (grey column), motility (horizontally striped column) and progressive motility (vertically striped column) as a function of DNA fragmentation. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

In our case study, the raw semen sample contained  $8 \text{ M mL}^{-1}$  spermatozoa with 0% motility. Cells had 10% vitality and 77.6% DF. After MACS separation, the vitality of spermatozoa increased from 10% to 73% (Figure 2). The DF index of separated sperm cells showed similar improvement, namely, the DF index decreased from 77.6% to 28.2% (Figure 3).



**Figure 2.** Sperm vitality (A) before and (B) after magnetic-activated cell sorting. Cells were labelled with eosin dye. Dead spermatozoa became red and viable spermatozoa remained colorless.



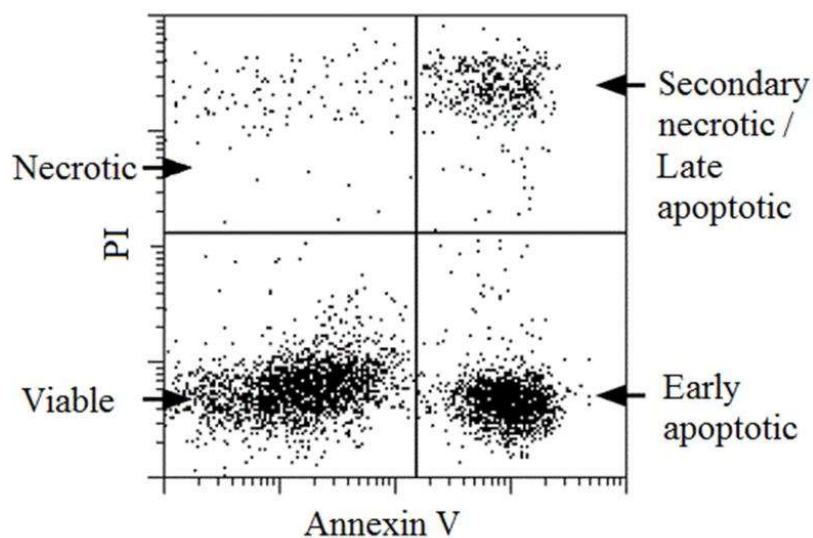
**Figure 3.** Demonstrative figure of sperm DF (A) before and (B) after magnetic-activated cell sorting. Cells were labelled based on the SCD method. Healthy cells show extended or moderate halos (green squares), while sperms with fragmented DNA show small or no halos (red squares).

#### 4. Discussion

Severe or absolute asthenozoospermia, without any motile sperm, is a problem that makes the fertilization process much harder because the distinction between viable and dead sperm cells is circumstantial. Only a few techniques are available for this purpose, for example, HOST, mechanical touch or laser-assisted selection of spermatozoa, but their application and success are still controversial [1]. In these cases, testicular sperm extraction (TESE) is recommended to isolate live spermatozoa with lower DF; however, this invasive process is often refused by the patient [4]. In our study, we presented evidence of how MACS separation is capable of improving sperm vitality in absolute asthenozoospermic samples. MACS is generally identified as a DF reducing method, but several correlations can be found between vitality and DNA integrity in the literature. Brahem et al. [5] observed vitality-dependent alterations in the DF index, namely, the lower the vitality, the higher the DF. In addition, Samplaski et al. [6] found <30% DF when the vitality was over 75% for most of the samples. This phenomenon has also been confirmed by others [7]. In agreement with the literature, a positive correlation was found between the severity of vitality/necrozoospermia and sperm DF (Figure 1). Both the decrement in sperm vitality and the increment in DF resulted in significant differences (Figure 1). Vitality had a significant impact on all of the measured parameters; DF showed significant increment, and concentration, motility, and progressive motility showed decrement. Increasing the DF resulted in similar effects; only the concentration did not change significantly. However, DF has a more significant impact on vitality than vice versa. Nothing proves this connection better than the significant improvement in the DF index after swim-up sperm preparation.

During swim-up, the motile fraction is separated from the immotile fraction, resulting in a strong increment in vitality, and due to the above findings, decrement in the DF [8–11]. This phenomenon is exploited by microfluidic separation chips, which improve the DF index, motility and, hence, vitality [12]. Unfortunately, the method is not suitable for immotile spermatozoa-containing semen samples. In another study, progressive motility was affected by altered DF; however, vitality was not influenced in this case [13]. Another very important conclusion can be drawn from the above statements, namely, some of the results of DF tests may be misleading because the results also include the data of non-living sperm cells. DF tests provide information on natural fertility, but these results could be incorrect if associated with the effects on the outcome of IUI/IVF/ICSI cycles. For IUI/IVF/ICSI cycles, one of the sperm preparation methods is used (density gradient centrifugation/swim-up), and in these cycles, the applied preparation method itself can reduce DF and improve vitality/motility [8–11]. Due to this, the results of DF tests and the outcomes of IVF/ICSI cycles cannot clearly determine the effect of fragmentation on clinical pregnancy, miscarriage or live birth rates; both neutral and negative effects can be found. To date, the effect is unclear; several meta-analyses are needed [14].

As we have discovered that there is a strong connection between vitality and DF, a fragmentation reducing method could be suitable for vitality improvement. MACS separation has been found to be appropriate for this purpose. During MACS sample preparation, cells are labelled with annexin V, which allows the molecules to bind with phosphatidylserine in the plasma membrane (Said et al., 2006). This is usually located in the inner layer of the plasma membrane, but during apoptosis, it moves to the outer surface and becomes accessible to the annexin V. On the other hand, in some necrotic cells, phosphatidylserine will be accessible on the inner surface due to the altered state of the plasma membrane (Figure 4). Using this approach, relevant increases in vitality were experienced after annexin V separation occurred (Figure 2). With MACS separation, the vitality of spermatozoa improved 7.3-fold (Figure 2). Although vitality did not rise to 100% and the separated sperm cell was still motionless, this method statistically improves the chances of fertilization with living spermatozoa. As the beneficial effects of MACS on DF have been published several times [15–18], our results are in agreement with the literature, showing huge decrements in the DF index (77.6% vs. 28.2%, Figure 3). Martínez et al. [19] discussed how MACS could not reduce DF in a small subpopulation of sperm samples, but they noticed its significant reducing capability in samples with highly degraded DNA. This observation also supports our results.



**Figure 4.** Schematic figure of annexin V positivity of sperm cells. Dead cells can be labelled basically with propidium iodide, but in some cases, these cells are also positive for annexin V.

## 5. Conclusions

In conclusion, our results and the literature clearly demonstrate the negative effects of DF on vitality and vice versa. Using this close relationship between the two parameters, we hypothesized that a method to reduce fragmentation could improve vitality. In addition, we were looking for a method that is suitable for the preparation of absolute asthenozoospermic samples; its operation is not based on sperm motility. The MACS technique has been found for this purpose. Annexin V is capable of binding both early apoptotic and late apoptotic/secondary necrotic cells, inducing the increment in the ratio of viable cells after magnetic separation. Both this study and the literature data suggest that the DF measurements of semen samples essentially reflect the levels of dead/dying sperm cells. The DF is, therefore, decreased by the elimination of these cells during most of the sperm preparation methods. The great limitation of this study is that it is only a case study, and the case number was not high enough due to the occurrence of absolute asthenozoospermia; therefore, no significant conclusions can be drawn. Further investigations are required, but our principle could be useful for TESE samples where no motile spermatozoa are found. Another problematic issue could be the potential cost of the method. The price can vary from center to center and manufacturer to manufacturer, but the average material cost of EUR 200–300 is far lower than the price of a fresh cycle. As this is a relatively cost-effective method, it should not limit its widespread use for further studies.

**Author Contributions:** G.M.: sperm analysis and sorting, study design, data collection, manuscript writing, final approval of the version to be submitted. A.B.: validation of sperm analyses, manuscript writing, final approval of the version to be submitted. L.M.: manuscript writing, final approval of the version to be submitted. P.C.: manuscript writing, final approval of version to be submitted. Á.S.: Head of the Urology Clinic, manuscript writing, final approval of the version to be submitted. A.T.: Head of the Reproduction Institute, manuscript writing, final approval of the version to be submitted. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the National Laboratory on Human Reproduction Program, funded by the Hungarian Government.

**Institutional Review Board Statement:** The study protocol has been approved by the National Public Health and Medical Officer (11550-6/2022/EÜIG) and the study was conducted in accordance with Helsinki Declaration.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationship that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

1. Ortega, C.; Verheyen, G.; Raick, D.; Camus, M.; Devroey, P.; Tournaye, H. Absolute asthenozoospermia and ICSI: What are the options? *Hum. Reprod. Update* **2011**, *17*, 684–692. [CrossRef] [PubMed]
2. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 6th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.
3. Said, T.M.; Agarwal, A.; Grunewald, S.; Rasch, M.; Glander, H.J.; Paasch, U. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod. Biomed. Online* **2006**, *13*, 336–339. [CrossRef]
4. Agarwal, A.; Sharma, R.K.; Gupta, S.; Boitrelle, F.; Finelli, R.; Parekh, N.; Durairajanayagam, D.; Saleh, R.; Arafa, M.; Cho, C.L.; et al. Sperm Vitality and Necrozoospermia: Diagnosis, Management, and Results of a Global Survey of Clinical Practice. *World J. Mens Health* **2021**, *40*, 228–242. [CrossRef]
5. Brahem, S.; Jellad, S.; Ibala, S.; Saad, A.; Mehdi, M. DNA fragmentation status in patients with necrozoospermia. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2012**, *58*, 319–323. [CrossRef]
6. Samplaski, M.K.; Dimitromanolakis, A.; Lo, K.C.; Grober, E.D.; Mullen, B.; Garbens, A.; Jarvi, K.A. The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2015**, *13*, 42. [CrossRef] [PubMed]
7. Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N.; Finnie, J.M.; Hedges, A.; McLachlan, R.I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: Development of diagnostic criteria. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 2415–2426. [CrossRef]



8. Jayaraman, V.; Upadhyaya, D.; Narayan, P.K.; Adiga, S.K. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2012**, *29*, 557–563. [CrossRef] [PubMed]
9. Muratori, M.; Tarozzi, N.; Carpentiero, F.; Danti, S.; Perrone, F.M. Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: Effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7492. [CrossRef] [PubMed]
10. Oguz, Y.; Guler, I.; Erdem, A.; Mutlu, M.F.; Gumuslu, S.; Oktem, M.; Bozkurt, N.; Erdem, M. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2018**, *35*, 1083–1089. [CrossRef] [PubMed]
11. Viswambharan, N.; Murugan, M. Effect of wash and swim-up and density gradient sperm preparation on sperm DNA fragmentation. *Mater. Today Proc.* **2021**, *45*, 2002–2005. [CrossRef]
12. Parrella, A.; Keating, D.; Cheung, S.; Xie, P.; Stewart, J.D.; Rosenwaks, Z.; Palermo, G.D. A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2019**, *36*, 2057–2066. [CrossRef] [PubMed]
13. Le, M.T.; Nguyen, T.A.T.; Nguyen, H.T.T.; Nguyen, T.T.T.; Nguyen, V.T.; Le, D.D.; Nguyen, V.Q.H.; Cao, N.T. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reprod. Med. Biol.* **2019**, *18*, 390–396. [CrossRef] [PubMed]
14. Chen, L.; Fang, J.; Jiang, W.; Wang, J.; Li, D. Effects of the sperm DNA fragmentation index on the clinical and neonatal outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. *J. Ovarian Res.* **2020**, *13*, 52. [CrossRef] [PubMed]
15. Bucar, S.; Gonçalves, A.; Rocha, E.; Barros, A.; Sousa, M.; Sá, R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2015**, *32*, 147–154. [CrossRef] [PubMed]
16. Degheidy, T.; Abdelfattah, H.; Seif, A.; Albuz, F.K.; Gazi, S.; Abbas, S. Magnetic activated cell sorting: An effective method for reduction of sperm DNA fragmentation in varicocele men prior to assisted reproductive techniques. *Andrologia* **2015**, *47*, 892–896. [CrossRef] [PubMed]
17. Chi, H.J.; Kwak, S.J.; Kim, S.G.; Kim, Y.Y.; Park, J.Y.; Yoo, C.S.; Park, I.-H.; Sun, H.-G.; Kim, J.-W.; Lee, K.-H. Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **2016**, *43*, 199–206. [CrossRef] [PubMed]
18. Lee, T.H.; Liu, C.H.; Shih, Y.T.; Tsao, H.M.; Huang, C.C.; Chen, H.H.; Lee, M.S. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 839–846. [CrossRef] [PubMed]
19. Martínez, M.G.; Sánchez-Martín, P.; Dorado-Silva, M.; Fernández, J.L.; Girones, E.; Johnston, S.D.; Gosálvez, J. Magnetic-activated cell sorting is not completely effective at reducing sperm DNA fragmentation. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2018**, *35*, 2215–2221. [CrossRef] [PubMed]