

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Humán spermiumok megtermékenyítő képességének új vizsgálati - és kezelési lehetőségei

Dr. Szűcs Miklós

Témavezető: Dr. Juhász Béla

Társtémavezető: Dr. Jakab Attila



Debreceni Egyetem

Táplálkozás – és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Debrecen,

2020

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	1
1.1.	A meddőség történelmi aspektusai	1
1.2.	A mesterséges megtermékenyítés története	3
1.3.	Spermatogenezis	4
1.4.	Kapacitáció.....	6
1.5.	A hímivarsejtek működését károsító tényezők	6
1.5.1.	Elhízás	6
1.5.2.	Varicokele.....	7
1.5.3.	Genetikai eltérések	9
1.5.4.	Obstrukció	10
1.5.5.	Hereleszállási zavarok	10
1.5.6.	„Idiopathias férfi meddőség”	11
1.6.	Az oxidatív stressz hatása a spermiumok megtermékenyítő képességére	11
1.7.	Empirikus kezelések.....	12
1.7.1.	Micronutriensek szerepe a fertilitásban	12
1.8.	Az andrológia mint tudományág.....	14
1.9.	A klasszikus spermavizsgálati paraméterek és a funkcionális vizsgálatok az andrológiai kivizsgálásban	14
1.10.	A funkcionális tesztek szerepe a modern andrológiai kivizsgálásban....	15
1.10.1.	Spermium penetrációs teszt.....	15
1.10.2.	Spermium-zona pellucida kötési tesztek	15
1.10.3.	Hipo-ozmotikus duzzadás teszt.....	16
1.10.4.	DNS fragmentációs tesztek	16
1.10.5.	Hyaluronsav-kötési assay (HBA [®]).....	17
1.11.	Akroszóma reakció.....	20
2.	Célkitűzések	21
3.	Betegek és módszerek	22
3.1.	Testtömegindex	24
3.2.	Ondóvizsgálat.....	25

3.3.	Hyaluronsav-kötési assay (HBA®).....	26
3.4.	Hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma (HB-MaSC).....	26
3.5.	Statisztikai elemzés	26
4.	Eredmények.....	27
4.1.	HBA-pontszám és HB-MaSC klinikailag infertilis férfiaknál.....	27
4.2.	A spermiumparaméterek, a HBA-pontszám és a HB-MaSC változásai kiegészítő kezelés után.....	27
4.3.	Hialuronánhoz kötődő érett spermiumok számának (HB-MaSC) korrelációja a testtömegindexszel (BMI).....	29
5.	Megbeszélés	36
6.	Összefoglalás.....	41
7.	Summary	42
8.	Rövidítések jegyzéke	43
9.	Irodalomjegyzék.....	46
9.1.	Hivatkozott közlemények	46
9.2.	Saját közlemények	55
10.	Tárgyszavak	58
11.	Köszönetnyilvánítás	59
12.	Függelék.....	60

1. Bevezetés

1.1. A meddőség történelmi aspektusai

Az utódok létrehozása genetikai ösztön, és ennek sikertelensége, a gyermeknemzési képtelenség a legkorábbi történelmi idők óta foglalkoztatja az emberiséget. A gyermeknemzés elősegítése céljából ősi rítusokat alkalmaztak, istenekhez fohászkodtak, áldozatokat mutattak be az ősi korokban, az ókori arabok pedig nagy szeretettel viseltek amuletteket, medálokat ebből a célból. A fennmaradt írásos emlékek szerint az ókori Görögországban a hippokratészi gyógyítás szerves része volt a termékenység kezelése, ahol természetesen isteni segítség is szükséges volt a sikerhez. Éppen ezért a kezelések általában a gyógyító isten, Aesclepius szentélyében történtek [1]. A babiloni kultúrában, ahol külön istennője volt a termékenységnek, és démona a koraszülésnek és az abortusznak, nagy szerepet kapott az asztrológia és a numerológia a meddőség vonatkozásában. Az akkori tudósok nagyon pontos megfigyeléseket tettek a holdfázisok és a menstruációs ciklusok, valamint a libidóváltozások, és így a termékenység és terméketlenség összefüggéseiben.

Az ősi hindu leírások is pontos megfigyelésekről adnak tanúbizonyságot. Ismerték, hogy egy terhesség 10 holdhónapig tart, és számos szertartást végeztek a terhesség fenntartása, a fejlődési rendellenességeket és infertilitást okozó démonok távoltartása céljából.

A népi megfigyelésekből is sokszor vontak le olyan következtetéseket, melyek alapján a termékenység fenntartására és a terméketlenség kezelésére alakultak ki rítusok, szokások. Kínai, ill. Jáván élő asszonyokról például leírták, hogy ebből a célból szárított placentát kaptak vagy megették saját placentájukat [2]. Már az ókori római, ill. perzsa és egyiptomi orvosok is egyértelmű összefüggést írtak le a férfi és a női testnedvek találkozásának az utódnemzéshez való szükségességéről, ám mivel konkrét embriológiai és mikroszkópos ismeretekkel nem rendelkeztek, így magának a fogamzásnak a ténye nem volt ismert.

Az európai korai középkori általános vélekedés szerint a meddőség egyedül női partnerben keresendő okokra volt visszavezethető, ennek hátterében sokszor lelki bűnbeesést tulajdonítottak. Jellemző volt, hogy amennyiben egy asszony nem esett teherbe (függetlenül annak okától) az már önmagában válóoknak minősült.

Ezt követően, a felvilágosulás korában a tudomány iránt érdeklődő közösségekben már nem volt evidens, hogy automatikusan a nőket okolták volna a pár gyermektelenségéért, sőt a XVII. századi Angliában a meddő férfiak már komoly egészségügyi és szociális problémaként voltak kezelve, mivel a terméketlenség ugyanolyan elítélendő és a férfiasságot aláásó dolog volt, mint az impotencia [3]. Mindezek ellenére, a széleskörű vélekedés továbbra is a nők problémájának ítélte a gyermektelenséget, de a tudományos kíváncsiság sok kutatót ösztönzött a férfi oldal megtermékenyítésben játszott szerepének vizsgálatára.

Már azelőtt, hogy Leeuwenhoek 1667-ben tudományosan is leírja a mikroszkóppal látott spermiumok létezését, a kor orvosai is már egyértelmű összefüggést írtak le az ejakulátum és a terhesség között. Felismerték, hogy az ejakulátum a megtermékenyítő-képesség fontos eleme, amely életet ad, ám azt a vér finomított szűrletének vélték és jelenlétét illetve mennyiségét a táplálkozással hozták összefüggésbe.

William Harvey 1651-ben közzétette a „Exercitationes de Generatione Animalium” című könyvét, melyben leírja az embriógenezisérről és a fogamzásról szóló elméleteket. Azt állította, hogy „Ex Ovo Omnia”, azaz az egész élet tojásból származik; szemben az addig elfogadott spontán generáció elméletével, amely azt állította, hogy az élőlények nem életképes anyagból fakadnak. Harvey könyvében következetes információkat nyújt a fogamzásról és az embriók fejlődéséről, annak ellenére, hogy akkor még a spermium és a petesejt nem voltak ismertek.

A mikroszkóp alatt felfedezett spermiumokat először parazitáknak hitték, és szerepének csak valamilyen trigger mechanizmust tulajdonítottak a megtermékenyítésben. Később úgy vélték, hogy a spermium feji részében egy előre formált, miniatűr embrió helyezkedik el (homunculus) ami a terhesség megkezdése után kezd el növekedni az anya szervezetében. (Preformáció-elmélet).

Ennek az elméletnek a megdöntésében az első lépés egy Caspar Friedrich Wolff által 1759-ben közzétett tanulmány volt, melyben a szerző megállapította, hogy a fejlődés kezdetén egy, az egyes szülők nemi szervéből képződött, homogén csíra a megtermékenyülést követően fokozatosan fejlődni, organizálódni kezd. Ez az állítás Epigenesis teória néven vált ismertté. Először ezt az elméletet hevesen megkérdőjelezték, ám idővel megerősödött, főként miután felfedezték a petesejtet, valamint azt, hogy mind a növényi, mind az állati szövetek sejtekből állnak, és ezek az összes élőlény morfológiai és funkcionális egységei (sejtelmélet). Miután kiderült, hogy az összes sejt már létező sejtekből származik sejtosztódással, új fejezet nyílt az embrionális fejlődés megértéséhez.

1824-ben Jean-Louis Prévost és Jean-Baptiste-André Dumas bizonyították, hogy a spermiumok szükségesek a megtermékenyítéséhez: különböző típusú állatok spermáját vizsgáló, széles körű vizsgálatok során megállapították, hogy mozgó spermiumok találhatók a szexuálisan érett férfiak, illetve gerinces és gerinctelen állatok hereszöveteiben is. Felfedezték, hogy a szexuális érettség előtt még nem találhatók spermiumok a herékben és megfigyelték, hogy ha a desztillált vízbe békapetét és herekivonatot raknak, a békapeték folyamatos változáson mennek keresztül, mely tulajdonképpen a korai embriogenezis leírása volt [4].

Mivel a spermiumok számlálásához addig nem voltak meg a feltételek, a XIX. században a férfi meddőség kivizsgálása gyakorlatilag a közösülési képesség vizsgálatára terjedt ki. Később már a posztkoitális váladék vizsgálatával, abban a spermiumok jelenlétének kimutatásával és az ejakulátumban lévő spermiumok számolásával tulajdonképpen a modern kori spermatológia alapjai kerültek lefektetésre. Magának az ejakulátumnak tudományos elemzésére és így annak minőségének esetleges javítására való igény a 1900-as évek elején merült fel. Ennek ellenére az 1930-as évek előtt a sperma klinikai elemzése gyakorlatilag nem volt kivitelezhető, mivel nem álltak rendelkezésre olyan standardizált adatok, melyekhez viszonyítva meg lehetett volna állapítani a férfiak megtermékenyítési képességét [5].

A múlt század 30-as éveiben aztán egyre több vizsgálat jelent meg, ahol már biometriai analízisek, festési eljárások alapján sikerült egy referenciaértéket felállítani mind morfológiai mind kvantitatív szempontból. Macomber és Sanders 1929-es tanulmányukban egyértelmű összefüggést mutattak ki a teherbeesések és a 60×10^6 spermiumszám/ml érték között. Ez lett az a referenciaszám, amelyet először alkalmaztak a klinikai gyakorlatban a spermiumszám normál értékeként [6].

1.2. A mesterséges megtermékenyítés története

Az első dokumentált emberen végzett mesterséges inszeminációt egy John Hunter nevű sebész végezte Londonban, az 1700-as évek végén, az első, sikeres terhességgel járó beavatkozást pedig az 1800-as évek közepén egy J Marion Sims nevű amerikai orvos végezte. Az első in vitro fertilizációval született nyulat 1939-ben mutatták be. Az eljárást Gregory Pincus amerikai biológus végezte, egy nőtény nyúl eltávolított petesejtjét sós vizes közegben megtermékenyítve egy másik nyúl uterusába visszaültetve.

Az első sikeres, azaz egészséges élő gyermek születésével járó humán in vitro fertilizácót (IVF) 1978-ban Steptoe és Edwards végezte egy petevezeték elzáródással diagnosztizált nőbetegen [7,8]. Az IVF során hormonális stimulációt követően ultrahang vizsgálattal követik a tüszők érését. Megfelelő időben az érett petesejtet tartalmazó tüszőtartalmat vékony tűvel – ultrahang ellenőrzése mellett – leszívják és a kinyert petesejtet egy speciális tápoldatba helyezik, majd az oldathoz adják az ugyancsak speciálisan előkészített hímivarsejteket. Amennyiben mikroszkópon keresztül megtermékenyülés, sejtosztódás látható, a leszívást követő 2-3. napon a szabályosan osztódó embriókat visszaültetik az méhbe. Az IVF különösen hasznos a férfi partner alacsony spermiumszáma, a női partner endometriosisa esetén, illetve – az Intracitoplazmatikus Spermium Injektálás (ICSI) megjelenéséig – az egyetlen lehetséges megoldása volt a teherbeesésnek kétoldali petevezeték elzáródás esetében.

A férfi eredetű meddőség miatti gyermektelenség megoldásában mérföldkő volt az ICSI kidolgozása, melyet Lanzendorf és munkatársai publikáltak 1988-ban [9]. Ez azért forradalmi eljárás, mert ebben az esetben már akár egyetlen, alkalmas hímivarsejt elegendő a megtermékenyítéshez. Az eljárás során a hímivarsejtet vékony, hegyes végű pipettába szívják és mikroszkópos kontroll alatt azt közvetlenül a leszívott petesejtbe injektálják. Ezt követően az eljárás a klasszikus IVF lépéseit követi, azaz jó megtermékenyülés és osztódás esetén az embriót a méhüregbe visszahelyezik.

Ez az eljárás már azozoospermia esetén (azaz, ha az ejakulátum nem tartalmaz spermiumot) is elvégezhető, amennyiben a herében fellelhető már beültetésre alkalmas érettségi fokú spermium előalak. Ebben az esetben a heréből vagy a mellékheréből az ún. Testicular Sperm Extraction (TESE), vagy Micro Epididymal Sperm Aspiration (MESA) technikák alkalmazásával – nyílt műtéttel vagy percutan tűszúrással – vesznek szövetmintát. Az ily módon nyert szövetmintát a továbbiakban az embriológiai laboratóriumban megvizsgálják és élő spermium tartalom esetén ezeket használják fel a megtermékenyítés céljára. A beavatkozás történhet mikroszkópos műtéti eljárással is (Microdissection Testicular Sperm Extraction (micro-TESE)). Ahhoz, hogy megértsük, hogy miért lehet a heréből vett sejtekkel beültetést végezni, a következő fejezet áttekinti a spermiogenezis, illetve a spermatogenezis folyamatait.

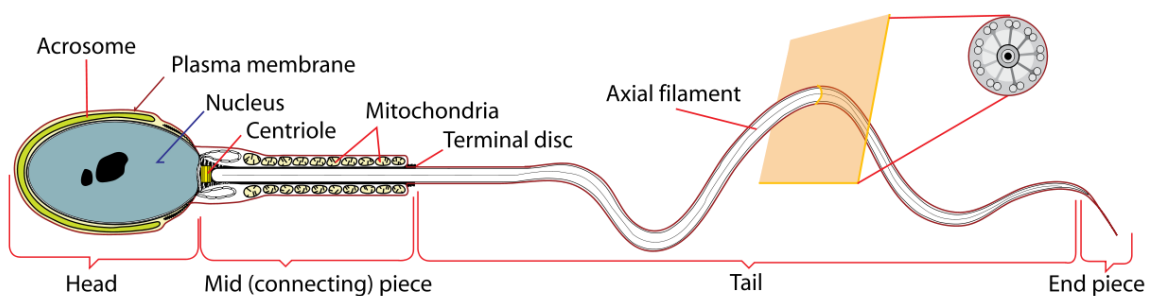
1.3. Spermatogenezis

A spermiumok a here parenchimáját alkotó kanyarulatcsatornában (tubuli seminiferi contorti) fejlődnek ki osztódás és differenciálódás útján. A Spermatocytogenesis során a

herecsatorna lamina basalisán nyugvó kerek sejtekből egyrészt A-típusú spermatogoniumok lesznek, melyek továbbra is összejtéként funkcionáló differenciálatlan spermatogoniumok maradnak, másrészt B-típusú spermatogoniumok alakulnak ki, melyek további spermium-előalakokká, elsőrendű spermatocytákká osztódnak mitózissal. A spermatogenezis következő szintjén az elsőrendű spermatocyták a meiosis profázisába kerülnek, mely mintegy 22 napig tart. Ez alatt az idő alatt a homológ kromoszómák egymásmellé rendeződnek, ekkor történik a „*crossing over*”, azaz a kromatidok átkeresztezése és a kromatid darabok kicserélődése. Így a meiosis további szakaszaiban történő osztódás során az anyai és apai eredetű kromoszómák már véletlenszerűen oszlanak szét az utódsejtekben, a másodrendű spermatocytákban. Ekkorra a sejtek kromoszomagarnitúrája 22+X vagy 22+Y, de mindegyik két kromatidból áll, azaz a sejtmagok DNS tartalma diploid. Ezt követően jön létre a második meiotikus osztódás, melynek során a másodrendű spermatocyták haploid DNS tartalmú spermatidákká osztódnak [10,11].

A spermatidák ezután egy érési folyamaton mennek keresztül (spermiohistogenesis) melynek végére alakulnak ki az érett hímivarsejtek [12]. Fentiek alapján tehát azon hímivarsejt előalakok, melyek már haploid DNS-el rendelkeznek, de még nem fejeződött be az érési folyamatuk, még alkalmatlanok a spontán természetes megtermékenyítésre, ám genetikai állományuk alapján a petesejtbe direkt bejuttatva (intracytoplasmaticus injektálás) alkalmasak lehetnek annak megtermékenyítésére. Ezen előalakok kinyerése a fentebb leírt technikákkal (TESE, MESA) történik.

Ahhoz, hogy természetes úton történő megtermékenyítés jöjjön létre, a spermiumok teljes érési folyamata végbe kell menjen. Ezen érési folyamat végeredménye az érett spermium, melynek feji részén ún. akroszóma-sapka található. Ez az akroszóma-sapka bontó enzimeket, többek között hialuronidázt tartalmaz, melyek szükségesek a petesejt zona pellucidáján (ZP) történő áthaladáshoz, a hímivarsejtek genetikai állományának petesejtbe juttatásához. (1. ábra)



1. ábra: Érett spermium

(Forrás: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Simplified_spermatozoon_diagram.svg)

1.4. Kapacitáció

A teljes megtermékenyítő képességet az érett spermium végül csak a női genitális traktusba jutva nyeri el, ahol a magban és az akroszómában további kémiai folyamatok játszódnak le, változik az intracelluláris ionok összetétele és fokozódik a sejt metabolizmusa. Ezt a folyamatot kapacitációnak nevezzük [13,14].

A kapacitáció során a spermiumról leválnak bizonyos, a mellékheréből és a szeminális plazmából származó, nem kovalens kötéssel kapcsolódó szterinek (például koleszterin) és glikoproteinek, melynek hatására megváltozik a sejtek membránszerkezete. Az eredmény egy folyékonyabb membrán, amely megnövekedett Ca^{2+} permeabilitással rendelkezik. A Ca^{2+} beáramlása megnöveli az intracelluláris cAMP szintet, ezáltal megnöveli a motilitást. Ezzel egyidőben a hímivarsejtek feji részének membránja is destabilizálódik, ami megkönnyíti a petesejtbe történő bejutását [15].

1.5. A hímivarsejtek működését károsító tényezők

A spermiumok termelődése, érése és megtermékenyítő képessége számos szervezeten belüli és szervezeten kívüli ágentől függ. A hímivarsejt termelődésének, érésének, transzportjának, a petesejthez történő kötődésének és az abba való bejutásának és a genetikai állomány átadásának zavara értelemszerűen férfi meddőséghez vezethet. Ezen ágensek némelyike nem befolyásolható, némelyik viszont műtéti úton vagy célzott illetve empirikus kezeléssel orvosolható.

1.5.1. Elhízás

Az elhízás a nyugati világ egyik fő egészségügyi problémája. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint, 2016-ban közzétett adatok alapján, a túlsúlyos felnőttek száma meghaladja az 1,9 milliárdot, az elhízott emberek száma pedig a 650 millió főt [16].

A túlsúlyosságnak a férfiak nemzőképességére kifejtett hatását mind állati modelleken, mind emberekben alaposan tanulmányozták, és tényét széleskörűen elfogadták [17-23]. Számos tanulmány alátámasztja, hogy a testtömegindex ($\text{BMI} = \text{Body Mass Index}$) sok egyéb életmódbeli tényezővel együtt (dohányzás, koffeinbevitel, kábítószer-használat, stb.) szintén negatív hatással van a férfiak termékenységére [24,25]. A magas BMI szoros összefüggésben áll az ondómennyiség csökkenésével [26], továbbá a tesztoszteron és a sex hormone binding globulin (SHBG) csökkent plazmakoncentrációjával és az ezzel járó emelkedett ösztrogén

plazmakoncentrációval is. Emellett a magasabb BMI esetén alacsonyabb LH és FSH hormon szinteket detektáltak, ami arra utal, hogy az elhízás hatással van a hipotalamusz – hipofízis tengely neuroendokrin szabályozó rendszerére is. Ennek hátterében az állhat, hogy a zsírszövet – főleg inzulinrezisztens esetekben – aromatázt expresszál, ami a tesztoszteront ösztradiollá alakítja. Ez az ösztadiol negatív visszacsatolás során csökkenti az agyalapi mirigy gonadotropin szekrécióját[27]. Ennek megfelelően bizonyos klinikai vizsgálatok azt mutatták ki, hogy az aromatáz-gátló kezelés jó hatású a férfi infertilitásra [28].

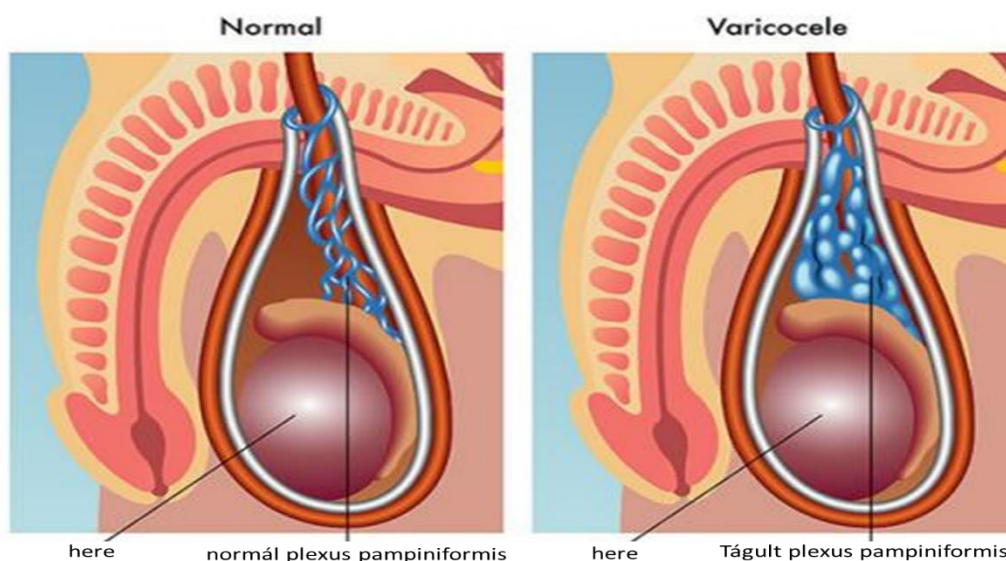
Az elhízás alvási apnoét is okozhat, mely felborítja az éjszakai tesztoszteron hormonszint ritmusát [29]. Ezen hormonális változások károsodott spermatogenesisist eredményeznek [30]. A túlsúlyosság csökkent DNS integritást és oxidatív stresszt okozhat [31], ugyanakkor az ondó paraméterei nem feltétlenül vannak ilyen egyértelmű kapcsolatban vele [32,33].

1.5.2. Varicokele

A varicokele a plexus pampiniformis abnormális tágulata, mely a vér visszafele áramlását okozza (2. ábra). Hátterében a vénabillentyűk hiánya, vagy elégtelensége, illetve a jobb és bal oldali vena spermatica közti anatómiai eltérés állhat [34]. A varicokele heretáji fájdalmat, a herefejlődés elmaradását, hypogonadismust és nemzőképesség-csökkenést okozhat. A spermatogenesisre gyakorolt negatív hatásának háttere még pontosan nem tisztázott, de számos faktor közrejátszhat benne. A reflux miatt megnövekedik a scrotális hőmérséklet, fokozódik az intratesticularis nyomás, így hypoxia és oxidatív stressz lép fel, a veséből és mellékveséből toxikus anyagok áramlanak vissza és károsítják a herét, hormonprofil eltérések lépnek fel, illetve a spermiumellenes antitestek képződésének kockázata megnőhet [35,36]. A varicokele az egyik leggyakoribb oka a férfi meddőségnek. A teljes felnőtt férfipopulációban mintegy 20%-os gyakorisággal fordul elő és elérheti a 40%-ot a meddő férfiak körében [34]. Megközelítőleg 90%-ban bal oldali a varicokele előfordulása. Amennyiben bal oldali az elváltozás, úgy 30%- 40% az esélye annak, hogy valójában kétoldali a betegség [34]. Izolált jobb oldali varicokelénél ellenben a lehetséges vesetumort mindig ki kell zárni [34].

A Valsalva manőverrel végzett fizikális vizsgálatot követően a diagnózisunkat color-flow Doppler UH vizsgálat erősítheti meg, a here körüli vénákban lassult áramlást mutatva, a vénák átmérője pedig típusosan nagyobb mint 3 mm. A varicokele súlyossági foka a subklinikaitól az 1-től 3-as fokú klinikai stádiumig terjed, valamint összefüggés mutatható ki a spermiumtermelés károsodása és a varicokele súlyossági fokozata között [35].

Műtéti megoldás csak azoknál az eseteknél javasolt, ahol klinikai varicokele mellett azonos oldali herevolumen csökkenés és/vagy abnormális spermiumkép, továbbá mással nem magyarázható infertilitás áll fenn [37,38]. Számos tanulmány megerősítette, hogy varicokelectomia után 30%-tól 60%-ig terjedő spermiumkép javulás érhető el [39,40]. A terápiás lehetőségek között scleroterápia, embolizáció és különböző műtéti megoldások szerepelnek. Jelenleg a subinguinális mikrodisszekciós módszer bizonyult a leghatékonyabbnak. Ennél a beavatkozásnál a legkisebb a szövődmény- és recidívaarány [37]. A legújabb tanulmányok alapján, a megfelelően szelektált férfiak közül a varicokelectomia a spontán fogant terhesség valószínűségét is növeli [35]. Emellett a másik leggyakrabban alkalmazott eljárás a laparoscopos véna spermatica klippelés, mely ugyancsak jó hatású, és aránylag egyszerű és gyors kivitelezhetősége miatt népszerű eljárás. A nyílt varicokelectomia – amikor az inguinalis régióban keresik fel a tágult vénákat és kötik le azokat – napjainkra sokat veszített népszerűségéből, mivel a nyílt műtét hátrányai mellett a finom, minél inkább nyirokér kímélő eljárás előnyei is hiányoznak ezen eljárás során, így az ilyen típusú beavatkozás esetén a leggyakoribb a későbbi szövődményként jelentkező hydrokele kialakulása.



2. ábra: Varicokele
(<https://www.stgeorgeurology.com.au/varicoccele>)

1.5.3. Genetikai eltérések

A férfi meddőség hátterének mintegy 10–15%-ában kromoszómaeltérések és génmutációk állnak [41]. Amennyiben ez a páciensnél felmerül, genetikai vizsgálat elvégzése szükséges.

Klinefelter-szindróma: a leggyakoribb nemi kromoszóma rendellenesség [42]. Ezen betegeknél a Leydig sejt funkció károsult, kisméretűek a herék, a fenotípusukban pedig az androgén deficiencia mutatkozik meg. A Klinefelter mozaicizmussal rendelkező betegeknél spermatogenesis fennállhat [43,44]. Ezekben az esetekben TESE vagy micro-TESE végzése javasolt és a mesterséges megtermékenyítés (IVF/ICSI) is sikeres lehet.

Sertoli cell only (SCO)-szindróma esetén a herékből hiányzik a csírasejtet termelő hám. Az elváltozás érintheti az egyik, vagy mindkét oldali herét. Fokális SCO esetén micro-TESE és ICSI segítségével a terhesség elérhető. Az esetek nagy része idiopathiás, de újabb kutatások bizonyították, hogy az SCO-t okozhatja genetikai rendellenesség, mint például az Y kromoszóma Yq11 vagy más néven az AZF (azoospermia factor region) régiójában bekövetkezett mikrodelécia [45].

Y-kromoszóma mikrodelécia: A férfi meddőség hátterében egyik gyakori genetikai ok az Y kromoszóma hosszú karján lévő, mikroszkóppal nem detektálható deléciók jelenléte. Ezek a deléciók legtöbbször azoospermiával járnak együtt, de bizonyos régiókban lévő deléciók csak oligozoospermiát okoznak. A mikrodeléciók sokszor mozaikos formában jelentkeznek, melyek kimutatása különösen nehéz, ám súlyos fokú oligozoospermia illetve azoospermia esetén fontos erre a genetikai elváltozásra is gondolni, melynek jelentősége nem a terápiában van, hanem abban, hogy a delécia sikeres intracitoplazmatikus iniciálás (ICSI) során a fiú utódban is jelen van. Mivel az y kromoszóma mikrodelécia a kor előrehaladtával romló spermiumképet is tud okozni, ilyen esetben a tudott átöröklés esetén a fiúgyermeknél minél hamarabbi spermiumanalízis és lehetőség szerinti spermiumfagyasztása is javasolt [46].

Kallmann-szindrómában urológiai szemszögből hypogonadotrop hypogonadismus, hereleszállási zavar, egyoldali vese-aplasia fordulhat elő. Kezelésként hormonterápia jön szóba HCG (humán chorion gonadotropin)-vel vagy HCG és FSH (follikulusstimuláló hormon) együttes adásával, mellyel indukálható a herefejlődés és a spermatogenesis [47].

Cisztás fibrózis (CF): egy autoszomális recesszíven öröklődő betegség. A mutáció egy, a kloridion-transzportban szerepet játszó ioncsatornát kódoló génen (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator – CFTR) jelentkezik. Ezeknél a betegeknél az ondóutak fejlődési rendellenessége jelenhet meg. A vas deferensek veleszületett hiánya lehet egy vagy

kétoldali (congenital unilateral absence of the vas deferens – CUAVD; congenital bilateral absence of the vas deferens – CBAVD) [48]. Amennyiben CBAVD, CUAVD vagy idiopathiás mellékhere-obstrukció diagnózisa felmerül, a CFTR-gén mutációjának vizsgálata javasolt [49]. CBAVD-vel rendelkező betegnél TESE útján lehet spermiumot nyerni, viszont fontos hogy, gyermekvállalás előtt a partnert is szűrni kell CF mutációra. Amennyiben a partner hordozó, CF vagy CBAVD kialakulásának az esélye az utódnál 50% [50]. Mindazonáltal CUAVD-vel rendelkező betegek általában fertilisek.

Egyéb genetikai kórképek

A teljesség igénye nélkül megemlíthető a *testis expressed 11 (TEX11) génmutáció*, *Prader-Willi-szindróma*, *Noonan-szindróma*, az *androgén-inszenzitivitás* kórképei, Robertson-transzlokáció stb. Ezen elváltozások ritkák, valamint ezeknél a betegeknél a gyermekvállalás sem szokott általában felmerülni.

1.5.4. Obstrukció

Obstructiv azoospermia során az ondóban spermium nem található. Az ondóutak elzáródása a herétől a mellékherén, vas deferensen keresztül a ductus ejaculatoriusokig tartó szakaszon fordulhat elő, mely az azoospermiás esetek mintegy 40%-áért felelős [49]. Az intratesticularis obstructio kezelésében csak a TESE jön szóba, azonban mellékhere obstructionál MESA ajánlott. Vas deferens szintjében található elzáródás esetében vasovasostomia, a ductus ejaculatoriusok obstructiója esetén pedig az ejaculatorius ductusok transurethralis rezekciója (transurethral resection of the ejaculatory ducts – TURED) javasolt.

1.5.5. Hereleszállási zavarok

A hereleszállási zavarok a leggyakoribb nemi szerveket érintő eltérések. A nem descendált herében a csírasejtek degenerációja az első életévben megkezdődik. Egyoldali hereleszállási zavar esetén a gyermeknemzés esélye szinte megegyezik az ilyen problémával nem rendelkezőkével (89,7% vs. 93,7%) [38]. Kétoldali hereleszállási zavar esetén azonban a spermatogenezis túlnyomó többségben károsodott, a fertilitási képesség ezeknél a betegeknél 35–53%-ra csökken [51]. A retineált here scrotumban való rögzítése (orchidopexia) javasolt az első- második életév során. Gyermekkorban hormonális kezelés is megpróbálható, míg felnőttkorban ellenjavallt. Postpubertálisan a nem descendált herékben megnő a malignus tumorok kialakulásának a kockázata. Felnőttkorban ezért eltérő terápiás protokollokat alkalmaznak: kétoldali cryptorchismus esetén orchidopexia javasolt, míg egyoldali cryptorchismus esetén a retineált here tumorprevenció céljából végzett eltávolítása, mely

beavatkozás a fertilitást nem befolyásolja [52]. Felnőttkorban végzett orchidopexia során herebiopsia elvégzése szükséges, in situ carcinoma kizárása céljából. Felnőttkori orchiectomia esetén a contralateralis herebiopsia elvégzését el kell végezni az ún. „high risk” (magas kockázatú) csoportba eső pácienseknél [53].

1.5.6. „Idiopathias férfi meddőség”

A férfigeddőség vizsgálatát során legalább 44% -ában nem találtak bizonyítékot a meddőségre [38]. Ezekben az esetekben valószínűleg a nem kimutatható női okok is szerepet játszhatnak, és sokszor valószínűsíthető valamilyen – akár átmeneti – funkcionális károsodás (hőhatás, stb.), és az utóbbi időben egyre nagyobb figyelem irányul az oxidatív stressz okozta károsodásra is.

1.6. Az oxidatív stressz hatása a spermiumok megtermékenyítő képességére

Ismert, hogy az oxidatív stressz hozzájárul a spermatogenezis károsodásához, mivel a spermiumok plazmamembránja nagy mennyiségű telítetlen zsírsavat tartalmaz, amely a sejteknek az akroszóma reakciójához és az oocita membránjaival való fúzióhoz szükséges. A telítetlen zsírsavak jelenléte azonban a membránt különösen érzékennyé teszi az oxidatív károsodásra. A magas reaktív oxigén szabadgyökök (ROS – Reactive Oxygen Species)-szintet (mint például a szuperoxid-anion és a hidrogén-peroxid) termelő spermiumok nem képesek a petesejt membránjával való fúzióra, ami férfi infertilitáshoz vezet. Emellett az ejakulátum plazmában jelen lévő fehérvérsejtek, különösen a neutrofilek, ugyancsak potenciális ROS-termelők lehetnek. Az antioxidáns-terápia ezért egyre inkább figyelmet kap, mivel hasznos lehet az oxidatív stressz okozta infertilitás kezelésében [54].

Az oxidatív stressz hozzájárul a spermatogenezis károsodásához, ami a férfiak infertilitásához vezet. A férfiak reproduktív szerveiben gyarapodó reaktív molekulák (oxigéngyökök, OH) károsíthatják a spermiumok sejtmembránját, ez pedig számottevően csökkent megtermékenyítő képességhez vezet. Az antioxidáns-terápia ezért hasznos lehet az oxidatív stressz okozta infertilitás kezelésében [55,56]. Legjobban az E- és C-vitamin, az L-karnitin, a cink, a Q10-koenzim és a folsav, valamint újabban a D3-vitamin hatását vizsgálták [57-65] és általánosságban kijelenthető, hogy az antioxidáns-terápia javíthatja a spermiumkoncentrációt és -motilitást, és mindemellett csökkentheti a DNS-fragmentáció mértékét is a spermiumban [66].

A komplex kiegészítő terápia előnyeit korábban alaposan tanulmányozták. Egy prospektív nyílt

klinikai vizsgálatban Busetto és mtsai (2012) 114 infertilis, asthenozoospermiás egyént kezeltek 18 hónapig komplex kiegészítő terápiával. A tanulmány végén, legalább 4 hónapos kiegészítő terápia után, nem volt szignifikáns javulás a spermiumkoncentrációban; azonban a progresszív spermium motilitás szignifikánsan nőtt, és 16 beteg partnere teherbe esett [67]. Az IVF-programban részt vevő férfiaknál az ondó minőségét is vizsgálták antioxidáns-terápia előtt és után egyaránt. Az eredmények azt mutatták, hogy az antioxidáns- és a mikronutriens-szupplementáció észrevehetően előnyös volt az IVF-résztvevőknél, különösen azoknál, akiknél oligo-astheno-teratozoospermiát (OAT) állapítottak meg [68]. Egy másik tanulmányban varicokeléssel diagnosztizált betegeket figyeltek meg műtét és kiegészítő terápia után. Azizollahi és mtsai. azt állapították meg, hogy a varicokelectomiát követő folát- és cink-szupplementáció eredményeképpen javult a spermiumok minősége, tehát ez egy hatékony kiegészítő terápia lehet a műtéti beavatkozás mellett [69].

1.7. Empirikus kezelések

Az idiopathiás férfi meddőség empirikus gyógyszereinek széles körét alkalmazzák, ám az empirikus megközelítésre kevés tudományos bizonyíték áll rendelkezésre. A klomifen-citrátot és a tamoxifent széles körben alkalmazták az idiopathiás OAT-ban, és egy, a közelmúltban végzett metaanalízis szerint, a spermiumok minősége és a spontán terhességek aránya javult a kezelés hatására [70]. Az androgének, a bromokriptin, az alfa-blokkolók, a szisztémás kortikoszteroidok és a magnézium-kiegészítők azonban nem hatékonyak az OAT-szindróma kezelésében. Egy 2013-ban készült áttekintő tanulmány eredményei azt sugallják, hogy a gonadotropinok (HCG/HMG – humán chorion gonadotropin/humán menopauza gonadotropin –, FSH vagy rekombináns FSH (r-h FSH)) előnyösek lehetnek az idiopathiás férfi faktor szubfertilitás kezelésében, ami a teherbeesések és az élve születések arányát tekinteti [71].

Az orális antioxidánsokat szedő férfiaknál szignifikánsan javultak a spermiumok paraméterei [72] és növekedés volt látható az élve születési arányban is IVF esetén [73]. Mindazonáltal a természetes koncepcióval kapcsolatban az antioxidánsok szerepe további vizsgálatokat igényel [74].

1.7.1. Micronutriensek szerepe a fertilitásban

A női prekoncepcionális folsav szedése óta tudjuk, hogy önmagában a táplálkozás nem mindig nyújtja ugyanazokat az előnyöket, mint a szupplement terápia.

A férfiak megtermékenyítő képességére ható ismert károsító tényezők kiküszöbölése mellett sokszor merül fel az igény olyan kezelésre, mely nem egy ismert, konkrét kóros állapot megváltoztatására irányul, hanem olyan vitaminokat, ásványi anyagokat, nyomelemeket, aminosavakat juttat be a szervezetbe, melyek antioxidáns vagy egyéb hatásmechanizmus útján segít a csökkent spermatológiai paraméterek és a spermium funkció javításában.

Papp György a 2000-es Andrológiai tankönyvében említi a cink-, a Pentoxifillin-, és a vitaminkezelés, illetve az aminosav- és a nukleotid terápia jótékony szerepét [13]. Cink kezelés hiányában a spermiumok érése, azok száma és mozgékonyága is zavart szenvedhet. Ugyanakkor a cinknek ondóhólyag és prosztatata szekréciós zavarok esetén is kedvező a hatása. A Pentoxifillin kezelés a spermiumok számának növekedését és mozgási paramétereinek javulását eredményezi. Az antioxidáns hatású C és E vitamin a spermiumok membránkárosodását okozó ROS ellen lép fel, ezáltal ezen vitaminok segítségével megakadályozható a membránkárosodás és a következményes mozgékonyági habitus csökkenés. Ugyancsak antioxidáns és emellett homocisztein-toxicitás gátló hatása van a B12 vitaminnak [75]. A spermiumok felszínén és a hereszövetben is kimutattak D vitamin receptorokat, és több tanulmány is igazolta, hogy a D vitamin jó hatású, a férfi megtermékenyítő képességre, valószínűleg a spermiumok mozgásának javítása miatt [76]. Az aminosav terápia hatékonysága abból adódik, hogy, az aminosavak egyrészt a spermiumok mozgékonyágában szerepet játszó struktúrfehérjék alkotói, másrészt megkötik a toxikus nehézfém ionokat, ezáltal védik a spermiumokat. Ezért alkalmazható pl. az arginin a spermiumok motilitásának fokozására [77], valamint jól ismert a karnitin fontos szerepe a spermiumok érési folyamataiban is [78]. A taurinnak leírták, hogy antioxidáns hatása mellett az FSH és tesztoszteron szekréciót fokozó hatása révén pozitív hatása van a spermium paraméterekre is [79]. Végezetül a nukleotidok jelenléte pozitív hatással van az ivarsejtek differenciálódására, segítik a fehérjeszintézist és energiát biztosítanak a folyamathoz, mindemellett a spermiumok flagellumainak rotációját is fokozzák.

Napjainkban több olyan komplex készítmény is elérhető, amely egy tablettában tartalmazza a jótékony hatású vitaminokat, aminosavakat, nyomelemeket, melyek hasznos kiegészítői lehetnek a férfimeddség terápiájának.

1.8. Az andrológia mint tudományág

A férfi megtermékenyítő-képesség vizsgálatával és kezelésével egy, a klasszikus orvostudományi diszciplínák között aránylag új tudományág, az andrológia foglalkozik. Az andrológia a kezdeti korszakában gyakorlatilag a spermatológiai vizsgálatokra specializálódott, később azonban komplex férfigyógyászati tudománnyá vált, mely magába foglalja a merevedési zavarok, az egyéb szexuális problémák, a férfi hormonális változások okozta eltérések kivizsgálását és kezelését, a férfi eredetű meddőség gyógyszeres és operatív kezelését, a férfi fogamzásgátlás problémakörét, és az utóbbi időben a mesterséges megtermékenyítési eljárások elterjedésével azok obligát feltételévé vált.

1.9. A klasszikus spermavizsgálati paraméterek és a funkcionális vizsgálatok az andrológiai kivizsgálásban

A spermatológia, mint a klasszikus kivizsgálási módszer, alapvizsgálat a férfi infertilitás kivizsgálásában. A konszenzusok (WHO kézikönyv, Krüger kritériumok, stb.) alapján a vizsgálat jól standardizált, így – ideális esetben – minden vizsgálóhelyen azonos értékelési elvek alapján történik az interpretáció, és a vizsgálati eredmények bárhol elfogadhatóak. Ám a klasszikus spermatológia az ejakulátum külleméről, viszkozitásáról, pH-járól, mennyiségéről, a spermiumok koncentrációjáról, mozgékonyságáról és morfológiájáról ad világos képet. Ezek a paraméterek felfedhetik a férfi nemzőképesség zavarát és sok esetben támpontot is adhatnak annak okainak kiderítésére, ám nem ritka, hogy a klasszikus spermium analízis során normál értékekkel rendelkező férfiak a gyakorlatban infertilisek. Ezekben az esetekben a klasszikus spermatológiai vizsgálattal az infertilitás okai egyértelműen nem tárhatók fel, az ezen értékelésen alapuló hagyományos spermium analízis nem feltétlenül tükrözi a spermiumok in vitro vagy in vivo megtermékenyítési képességét [80]. Az elmúlt évtizedekben az intracitoplazmatikus spermium injekció egyre inkább előnyben részesített módszer lett azoknak a meddő pároknak az esetében, akiknél korábban nem sikerült az infertilitás egyértelmű okát igazolni. Ezen eljárások során egyértelművé vált, hogy a klasszikus sperma paraméterek nem befolyásolják az IVF eredményeit, ellentétben azokkal a molekuláris és sejtszintű eltérésekkel, amelyeket viszont az alap spermatológiai vizsgálatokkal nem lehet kimutatni. Mindezek miatt napjainkra az andrológiai klinikumban konszenzus alakult ki arra vonatkozóan, hogy sok esetben átfogóbb spermiumfunkciós vizsgálatokat kell végezni, azaz: a párok terhességi esélyeire vonatkozó

jobb prediktív értékkel rendelkező kiegészítő vizsgálatok szükségesek, illetve hogy fontos, hogy a sejt- és molekuláris szinten előforduló sperma diszfunkciót minél jobban azonosítsuk.

Ideális esetben az ejakulált spermiumoknak jó kapacitációs képességük kell, hogy legyen, fel kell ismerniük a zona pellucidát és képesnek kell lenniük az ún. akroszóma reakcióra, hogy képesek legyenek a petesejt megtermékenyítésére. Az ezeket a képességeket értékelő vizsgálatokat nevezzük spermium funkcionális vizsgálatoknak.

1.10. A funkcionális tesztek szerepe a modern andrológiai kivizsgálásban

Habár a klasszikus spermatológiai eljárások során is léteznek olyan tesztek, melyek a funkcióról is információt adnak, ezen vizsgálatok – pl. a vitális festés – inkább csak a spermiumok életképességéről adnak felvilágosítást, de élő spermium esetén nem tárják fel a sikertelen megtermékenyítés okát férfi oldali meddőség esetén. A modern értelemben vett funkcionális tesztek a spermiumok megtermékenyítő képességét vizsgálják in vitro körülmények között.

1.10.1. Spermium penetrációs teszt

Az egyik első kifejlesztett funkcionális vizsgálat a spermium-penetrációs vizsgálat (SPA) volt [81]. A vizsgálat során a humán spermiumokat hőrcsög petesejtekkel hoznak össze, amelyek nem rendelkeznek zona pellucidával. A vizsgálat a spermiumok kapacitációs képességét, az akroszóma reakciót, az oolemmával való fúziót és azon való áthatolást, valamint a hőrcsög oociták citoplazmájában történő dekondenzációs képességet méri. E vizsgálat standardizálása és reprodukálhatósága alacsony és hátránya, hogy eltér a valós élettani állapotoktól, mivel a zona pellucida nincs jelen az eljárás során, így a terhességi kimenetelre vonatkozó prediktív értéke gyenge [82].

1.10.2. Spermium-zona pellucida kötési tesztek

A spermatazoa és a zona pellucida közötti kapcsolat rendkívül kritikus és a sperma funkció számos jellemzőjével kapcsolatban adnak lényeges információkat az ilyen vizsgálatok. Több, eltérő vizsgálati módszer is létezik, melynek során a hőrcsögből nyert vagy korábbi sikertelen in vitro eljárásból származó petesejtek zona pellucidát fluoreszcens festékkel jelölt spermiumokkal inkubálják, ám mindegyik elsődleges eredményként értékeli a spermiumok szoros kötődését a ZP-hoz [80,83]. Fontos megjegyezni még, hogy magas

prediktív értékeket mutattak ki a sikeres inszeminációs és in vitro fertilizációs kimenetekre.

1.10.3. Hipo-ozmotikus duzzadás teszt

A hipo-ozmotikus duzzadás teszt (hypo-osmotic swelling test – HOST) az életképes spermiumok ép membránszerkezetének meglétén alapul. Az intakt hímivarsejt membránja fontos szerepet játszik a fertilizálási folyamat során. A HOST lényegében egy spermium szelekciós eljárás, amely olyan esetekben indikált, amikor az ejakulátumban nagyon kevés vagy nincs mozgó spermium. A hipo-ozmotikus körülmények között az érintetlen spermium sejtek intracitoplazmatikus terei megduzzadnak, és a farkaik felcsavarodnak. A nem sérült membránnal rendelkező, ám nem élő spermiumok nem képesek megduzzadni a hipotóniás közegben. Ezen vizsgálatnak az eredményei korrelálnak más ejakulátum vizsgálati mutatókkal, mint például a morfológia és a mozgékonyosság, de a termékenységre vonatkozó adatok nem megfelelőek [84].

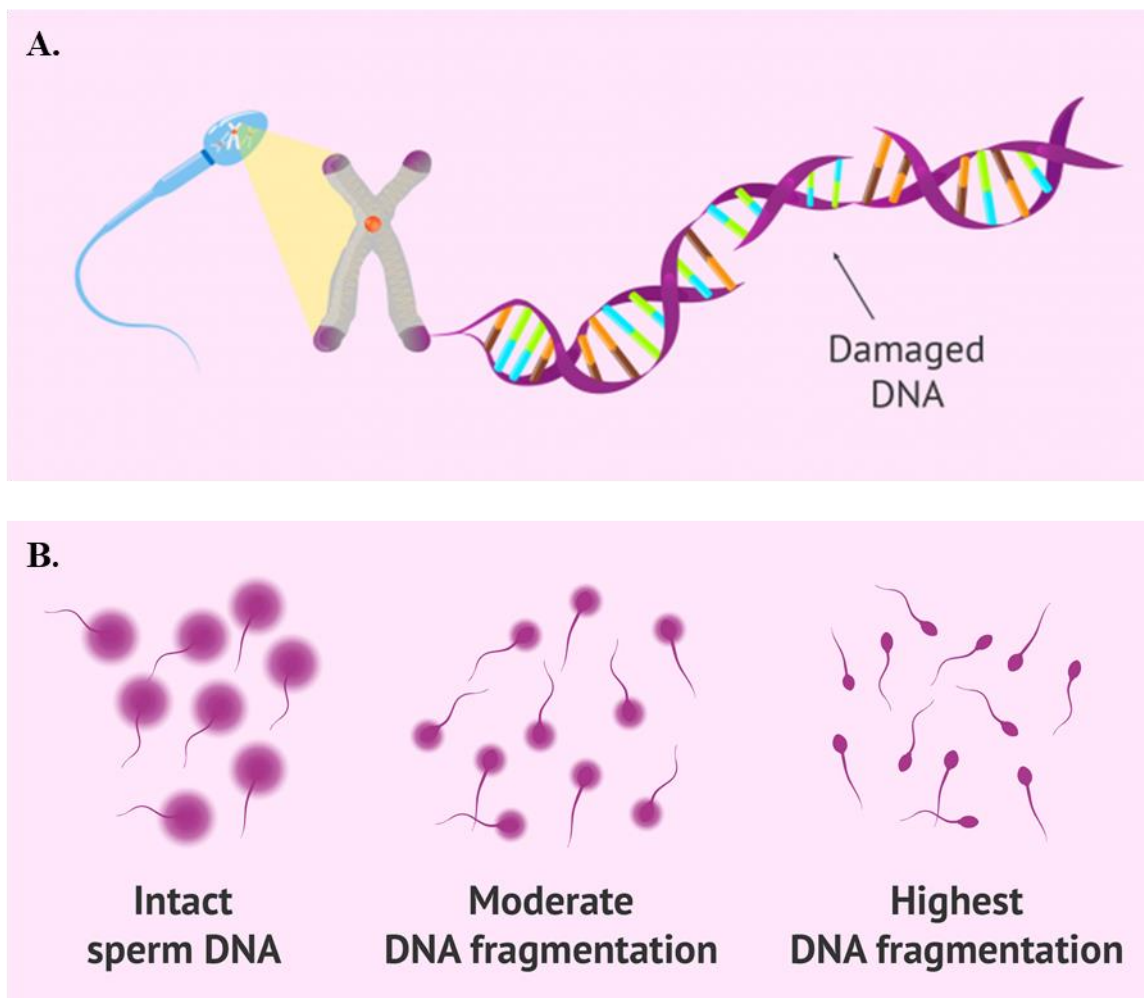
1.10.4. DNS fragmentációs tesztek

Az életképes terhesség kialakulásához kiemelkedő jelentőségű az apai genom integritása. A spermiumban lévő fragmentált DNS nem kompatibilis a normális embrionális fejlődéssel. A DNS-károsodás a spermatogenezis során bekövetkező kromatin átalakulás, apoptózis, vagy DNS-szálszakadás következtében fordulhat elő. Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a hímivarsejt mellékherén való áthaladása során bekövetkezett post-testicularis károsodás, a környezeti toxinok vagy ROS által a genitális traktusban indukált frakcionálás is jelentős szerepet játszhat a spermium DNS fragmentációjának kialakulásában [85,86].

A megfelelően csomagolt DNS-t in vitro dekonzenzációval lehet tanulmányozni, amelyet etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), a petesejtben jelen lévő glutation vagy ditiotreitol (DTT) indukál. Ugyanakkor a sérült vagy nem megfelelően felcsavarodott DNS-sel rendelkező spermiumok nem mutatnak teljes DNS-dekonzenzációt [87,88]. A károsodást mutató spermiumok aránya fontos, mivel a normál mintákban több mint 70%-a a spermiumoknak dekonzenzáció-pozitivitást mutat, és ez az arány egyezik az in vitro fertilizáció során sikeres terhességgel járó beavatkozások arányával [89].

A sperma kromatin dekonzenzáció mértékét az ún. spermium kromatin diszperziós (SCD) teszttel tudjuk kimutatni. E célból a spermiumokat előkezelik olyan anyagokkal, amelyek megakadályozzák a DNS-hurkok kialakulását. Ennek eredményeként az ép DNS-sel

rendelkező spermiumok nagyobb sperma-kromatin-diszperziós arányt mutatnak, míg a sérült DNS-ekkel rendelkező spermiumok esetén a fej körül diszpergált ún. DNS halo-k alacsonyak vagy nem látszanak (3. ábra).



3. ábra:
*Spermium DNS fragmentáció (A.) és az azt kimutató „Halo”
 effektus (B.)*

(Forrás: <https://www.invitro.com/en/sperm-dna-fragmentation>)

1.10.5. Hyaluronsav-kötési assay (HBA[®])

Az elmúlt években az andrológiai gyakorlatba bevezetett új, a spermiumok funkcionális vizsgálatát lehetővé tevő tesztek közé tartozik a hyaluronsav-kötési assay (HBA[®]) (4. ábra), amelynek elvégzése egyszerű, ám igen hatékonynak bizonyult a tervezett asszisztált reprodukciós beavatkozás előtt [90].

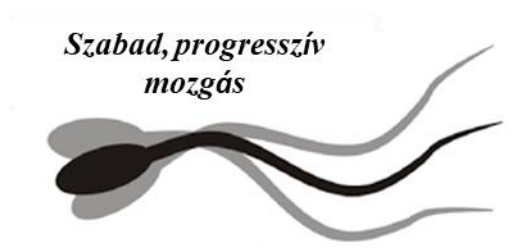
A HBA[®] elméleti alapja az, hogy a hyaluronsav az emberi testben szinte az összes szövettípusban jelen van csakúgy, mint a női genitális traktusban, például a cervikális nyákban

vagy a cumulus oophorusban, amellyel a spermium kapcsolatba lép [91,92]. Csak a hyaluronsav kötő receptorokat (HBR) expresszáló, érett spermiumok képesek a hyaluronsavat tartalmazó poliszacharid mátrixból álló cumulus sejtjeihez kapcsolódni [93]. A spermiumok érési folyamata során a HBR-ek mellett további specifikus receptorok, például a hialuronidáz enzim-aktivitással rendelkező PH20 fehérje is jelen van még az érett spermium membránján és a lizoszómából származó akroszómában is. Az érett spermium ezen enzime (PH20) képes a cumulus oophorus sejtjeit összetartó, hyaluronsavat tartalmazó mátrix feloldására [94]. A spermium és a petesejt közötti kapcsolatot a petesejt felszínén elhelyezkedő, hímivarsejtre specifikus ZP3 (Zona pellucida sperm-binding protein 3)-kötő receptor és az úgynevezett ZP3 horgonyzott fehérje alapozza meg [95]. Fontos megemlíteni, hogy a spermium által expresszált, fent említett receptorok az érési folyamat részei a férfi genitális traktusban; ezért a női genitális traktusra nincs szükség a vizsgálati eljárásban. Újabban bebizonyították, hogy a HspA2 (Heat shock-related 70 kDa protein 2) chaperone fehérje lehet a felelős a spermium éretlensége (amely hozzájárul többek között a hyaluronsav kötő receptor, a ZP3-kötő receptor és a PH20 enzim hiányához) és az aneuploiditás közötti kapcsolatért [96]. Számos tanulmány feltárta, hogy az éretlen spermium HspA2-szintje alacsony, ezért azok nem képesek kapcsolódni a zona pellucidához, ami különböző osztódási hibák emelkedett arányához vezet a meiózis során [97-99]. In vitro csak az érett spermiumok képesek a hyaluronsavval kezelt felszínhez kapcsolódni – hasonlóképp, mint in vivo a zona pellucidához –, ami egy új lehetőséget jelent az érett és az éretlen sejtek megkülönböztetésére.

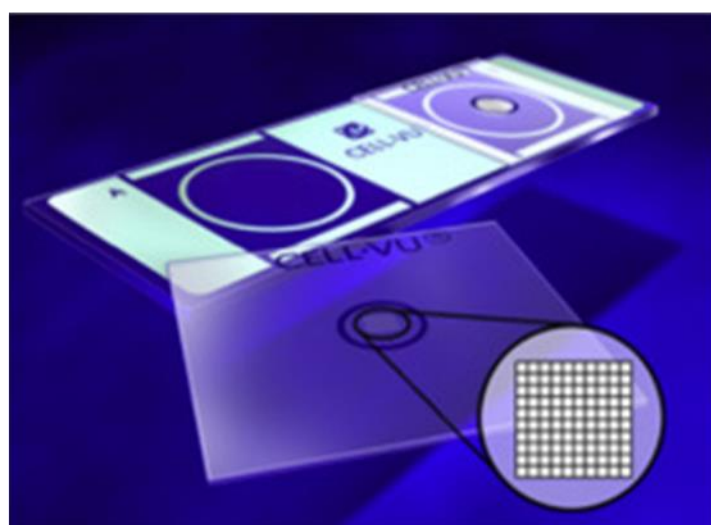
Huszár és munkatársai kifejlesztettek és sikeresen alkalmaztak egy spermiumszelekciós módszert az érett spermiumok ezen hialuronán-kötési képességére alapozva [92,100,101]. A hialuron-kötéssel elvégzett spermiumszelekció egy biztonságos és ígéretes spermiumszelekciós módszer az intracitoplazmatikus spermiuminjekció hatékonyságának javítására, ami elvezetett az „intracitoplazmatikus spermiuminjekcióra kiválasztva” (Picked for Intracytoplasmic Sperm Injection, PICSⁱ, Biocoat Inc., Horsham, PA, USA) módszer klinikai gyakorlatba történő bevezetéséhez [102-106]. Az újabb szakirodalmak a PICSⁱ rövidítés magyarázataként már a „Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection” kifejezést adják meg, mely találóbb, jobban kifejezi az eljárás lényegét, miszerint a legmegfelelőbb spermium kerül kiválasztásra [107]. Ez a kiválasztás hatékonyan csökkenti a számbeli kromoszomális rendellenességek utód felé történő átadásának kockázatát is [101]. Yagci és munkatársai 2010-ben demonstrálták, hogy a hyaluronsav magas fokú szelektivitást mutat a jó DNS-integritású spermiumokra, és így a HBA[®] vizsgálat információt ad a DNS integritásáról is, sok esetben a genetikai vizsgálat

kiküszöböléséhez vezetve ezzel [108]. Összefoglalva, a spermium kötődése a hyaluronsavhoz (hyaluronic acid – HA) korrelál a következőkkel: a sejt érettsége, alacsonyabb fokú kromoszomális aneuploiditás, csökkent DNS-fragmentáció, a kromatin fokozott integritása, normális fejmorfológia és következésképpen jobb megtermékenyítő-képesség [91]. A hyaluronsavhoz kötődő spermiumok százalékos aránya alapján korábbi tanulmányok meghatározták a férfiak megtermékenyítő-képességének különböző szintjeit. Kiterjedt, jól tervezett tanulmányok megállapították, hogy a terhesség elvesztésének aránya szignifikánsan magasabb volt, ha az eljárás előtti HA-kötődés 65% alatt volt [105], így a hialuronán-kötés alsó referenciahatárát 65%-nak tekintjük.

Kötött, Motilis spermium



Nem-kötött, Motilis spermium



4. ábra: HBA[®] teszt

1.11.Akroszóma reakció

A petesejt membránját egy glikoproteinekből álló zóna (zona pellucida) veszi körbe, melyeken kívül helyezkednek el a cumulus oophorus sejtjei. A cumulus oophorus sejtjeit nagyrészt hyaluronsav tartja össze, melyen – a spermium membránjához kötött enzimekkel, bontva a sejtek hálózátát – a mozgékony spermiumok áthaladnak, majd az érett és a kapacitációs folyamaton is átment spermiumok érintkezésbe lépnek a petesejt zona pellucidájával. Ilyenkor az akroszómális bontó enzimek kiszabadulnak a már destabilizálódott hímivarsejtből, és a spermium membrán petesejt membránjával való összeolvadásából létre jön a spermium – ovum fúzió. A petesejtben ezen inger hatására beindul a II. meiotikus osztódás, végül a hímivarsejt petesejtbe történő inkorporációjával létre jön a megtermékenyítés, melynek során a sejtmagok membránjának felszakadozásával, a nucleus dekonzenzációjával, továbbá a spermium és a petesejt magjának összeolvadásával beindul az osztódás [13,109].

2. Célkitűzések

Mint a fentiekből látható, a klasszikus spermatológiai vizsgálat gyors, költséghatékony, de számos mai eljáráshoz nem ad lényegi információt, a funkcionális tesztek pedig főleg az in vitro megtermékenyítés szempontjából vizsgálják a megtermékenyítő-képességet. Mivel a spermiumsűrűségekre szükség van a kezelési stratégiákhoz, és a motilitás befolyásolja a HA-kötési kapacitást, azt feltételezzük, hogy a mindennapi andrológiai gyakorlatban a HBA-eredmény egyszerűen önmagában, a spermiumsűrűség és a progresszíven mozgó spermiumok arányának ismerete nélkül nem biztosít elégséges információt a férfiak fertilitásának megítéléséhez.

Kutatócsoportunkban felmerült az igény egy olyan érték felállítására, mely figyelembe veszi a spermiumszámot, a mozgást és jó képet ad a spermiumok kapacitációs képességéről is.

Fontos azt is az meghatározni, hogy hol van az antioxidáns kezelés helye a férfi infertilitás kezelésében, valóban hatékony-e az adjuváns terápia, és hogyan lehet mérni objektív módon annak funkcionális hatékonyságát.

Mindezek alapján első tanulmányunk célkitűzései a következők voltak:

1.) A HBA vizsgálatot tovább fejlesztve új index, a HB-MaSC (Hyaluron Bound Matured Sperm Count) bevezetése, mely a HB kötődési kapacitáson túl figyelembe veszi a spermium denzitást és a mozgékonyságot is. Következésképpen a vizsgálat és eredménye ötvözi a klasszikus és az új funkcionális vizsgálatok elemeit.

2.) Megmérni a perorális kiegészítő terápia hatékonyságát a férfimedddőség kezelésében a HBA pontszám és az új mutató alkalmazásával.

Másik tanulmányunk célja az új index – HB-MaSC – alkalmasságának és felhasználhatóságának vizsgálata andrológiai betegek esetében. Vizsgálatunkban az egyik leggyakoribb károsító tényezőnek, az elhízásnak a konvencionális ondóparaméterekre (spermiumkoncentráció és progresszív motilitás) és a hialuronán-kötésen alapuló megtermékenyítő-képességre gyakorolt hatását, valamint az általunk kifejlesztett új index (HB-MaSC) mindennapi andrológiai gyakorlatban való alkalmazhatóságát elemeztük.

3. Betegek és módszerek

A hyaluronsav-kötési assay és egy belőle származó új fertilitási mutató alkalmaságának a kvantifikálására olyan paraméterek vizsgálatában, mint a férfiak megtermékenyítő képessége és a kiegészítő terápia hatékonysága. 175, több mint 12 hónapig terméketlen kapcsolatban élő, 18 éven felüli beteg adatait vizsgáltuk és értékeltük ki. A rutin andrológiai vizsgálat nem derített ki semmilyen gyógyszeres vagy műtéti kezelésre szoruló rendellenességet. Minden betegnél elvégeztük a fizikális vizsgálatot, a herék ultrahangos vizsgálatát, a mikroszkópos ondóvizsgálatot (a WHO ondóvizsgálatra vonatkozó kézikönyvének 2010-es, ötödik kiadása alapján) és a HBA-tesztet. A tanulmány tartalmazza a 175 férfi közül 39 betegnek a nyomon követését is, akiket mikroszkópos ondóvizsgálattal és HBA[®]-tesztel ellenőriztünk a kiegészítő terápiát követően (kezelt csoport); a fennmaradó 136 betegnél csak egy vizsgálatot végeztünk, mivel ismeretlen okokból nem jelentek meg a kontrollvizsgálaton (kezeletlen csoport), ezért az adataik nem szerepelnek az összehasonlító statisztikai elemzésben.

Az átlagos életkor 33,41 ($\pm$ SD 3,71) év volt a kezelt és később kontrollált férfiaknál ($N = 39$) és 34,65 ($\pm$ SD 4,72) év azoknál a betegeknél, akik az egyszeri vizsgálaton vettek részt ($N = 136$).

Jelen tanulmányban a betegek komplex étrend-kiegészítőket szedtek szájon át a kezelés során, amelyek a legtöbb olyan nutritív tényezőt tartalmazták megfelelő dózisban, amelyek korábbi tanulmányokban hatékonynak bizonyultak, és magas antioxidáns tartalmuk van: L-karnitin-L-tartarát 148 mg, arginin-hidroklorid 90,78 mg, taurin 125 mg, tokoferol-acetát (75%) 105 mg, C-vitamin 63 mg, magnézium-oxid 78,20 mg, cink-szulfát-monohidrát 9,61 mg, béta-karotin (20%) 9,45 mg, D3-vitamin 100 000 IU g⁻¹, B12-vitamin (0,1%) 1,31 mg, piridoxin-hidroklorid 0,97 mg, Q10-koenzim 5,25 mg, folsav 0,21 mg, nátrium-szelenit-mannit (Se 0,2%) 9,19 mg (FER14[®], forgalmazza az Andromedic Kft., Debrecen, Magyarország) [78,102,110-114]. Az étrend-kiegészítő terápia legalább három, legfeljebb hat hónapig tartott a beteg-együttműködéstől függően, és a kontrollvizsgálat a perorális terápia befejezése után történt. A nyomon-követési idő az első vizsgálatot követő 3 és 6 hónap között változott, átlagos hossza 3,4 hónap volt. A megfigyelés ideje alatt nemkívánatos- és/vagy mellékhatások nem jelentkezték.

A spermatológiai vizsgálatokat egy standard, négynapos önmegtartóztatást követően végeztük fáziskontraszt-mikroszkóppal (200–400-szoros nagyítás) és Makler-féle számlálókamrával,

állandó körülmények mellett (szobahőmérsékleten a cseppfolyósodott natív ondó 10 µl-ét felhasználva). Legalább két analízist végeztünk, és az eredmények átlagát vettük figyelembe. Az adatgyűjtést és -értékelést a WHO emberi ondó vizsgálatára és feldolgozására vonatkozó laboratóriumi kézikönyve ötödik kiadásának (2010) normái alapján végeztük.

A spermiumok funkcionális értékelését a kereskedelmi forgalomban elérhető HBA[®] tesztekkel (Biocoat Inc., Horsham, PA, USA) végeztük. A tesztet a gyártó ajánlásai szerint végeztük el. Röviden összefoglalva a vizsgálat a következőkből állt: 7–10 µl natív ondót cseppentettünk hyaluronsavval bevont speciális tárgylemez felszínére, végül 10-15 percnyi, szobahőmérsékleten történő inkubálás után meghatároztuk a spermiumok kötődési arányát (4. ábra).

Az eddig használt paramétereket (spermiumsűrűség, motilitás, morfológia) és a HBA[®] teszt eredményeit kombinálva gyakorlati szempontból hasznosnak találtuk, hogy ezeket az adatokat egy mutatóba rendezzük össze. Ezt a mutatót HB-MaSC-nek (hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma) nevezzük, amely az egy ml ondóban található spermiumok számának, a progresszíven mozgó spermiumok százalékos arányának és a hyaluronsavhoz kötődő, mozgó spermiumok percentilisének szorzatát adja meg. A progresszivitást (PR) a WHO kézikönyvének (2010) kritériumai szerint határoztuk meg 10^6 / ml mértékegységben [115].

$$\text{HB – MaSC} = \text{Spermiumok száma (} 10^6 \text{ /ml)} \times \text{WHO – PR (\%)} \times \text{HBA}^{\text{®}} \text{ pontszám (\%)}$$

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) fertilis férfiakra vonatkozó referenciaértékei és a HBA-val kapcsolatos korábbi tanulmányok szerint a HB-MaSC alsó referenciahatára $5,6 \times 10^6$ /ml (a WHO értékeinek használata a „10 centilisekhez” tartozik).

A statisztikai teszteket a STATISTICA for Windows (StatSoft Hungary Ltd., Budapest, Hungary) használatával végeztük. T-teszteket, Mann–Whitney-tesztet és khi-négyzet-próbát alkalmaztunk az elemzésben.

A másik vizsgálatunkban a hialuronánhoz kötődő érett spermiumok számának (HB-MaSC) korrelációját vizsgáltuk a testtömegindexszel (BMI). A vizsgálatban 72 olyan férfi vett részt, akiket andrológiai kivizsgálásra utaltak 12 hónapnál hosszabb ideje tartó, meddő párkapcsolat miatt. A vizsgált páciensek életkora 24–43 év közötti (átlagos életkor: 33,9) volt. Minden betegnél elvégeztük a BMI kiszámítását, a herék fizikális és ultrahangos vizsgálatát, az ondó mikroszkópos analízisét és a HA-kötő képesség vizsgálatát. Kiszámítottuk a hialuronánhoz kötődő érett spermiumok számát (HB-MaSC) is [116].

A gyógyszeresen vagy sebészileg kezelhető rendellenességek a kizárási kritériumok részét képezték. Kizártuk azokat a betegeket is, akiknél klinikai jelentőséggel bíró varicokele, 25 cm³-nél kisebb heretérfog, illetve egyéb ismert egészségügyi tényező, például súlyos hormonális eltérés vagy rendszeres dohányzás állt fenn. Kizártuk továbbá a teratozoospermiát mutató betegeket is, akiknél a normális spermiummorfológia 4% alatti volt, Krüger szigorú kritériumai alapján [115].

3.1. Testtömegindex

Habár nem a valódi testzsírszázalékot tükrözi, a BMI-t elfogadják és széleskörűen alkalmazzák az ideális testtömeg és az attól való eltérés mértékének megállapítására klinikai kutatásokban csakúgy, mint az orvosi, ezáltal pedig az andrológiai gyakorlatban. A BMI-t a kilogrammban kifejezett testtömeg és a méterben kifejezett testmagasság négyzetének hányadosa határozza meg (kg/m²), így a BMI mérése költséghatékony és könnyen kivitelezhető (1. Táblázat) [117]. Az antropometriai adatokhoz, melyekből kiszámoltuk a BMI-t, a magasságot és a testtömeget magasságmérővel, illetve mérleggel mértük. Súlymérésnél és magasságmérésnél is az alanyok könnyű ruházatot viseltek cipő nélkül.

	Egység kg/m²	Betegség kockázat
Alultáplált	≤19,9	Emelkedett betegségkockázat
Normális	20–24,9	Normális
Túlsúlyos	25–29,9	Emelkedett betegségkockázat
I. fokú elhízás	30–34,9	Magas betegségkockázat
II. fokú elhízás	35–39,9	Nagyon magas betegségkockázat
III. fokú elhízás	≥40	Rendkívül magas betegségkockázat

1. Táblázat

A testtömegindex és a betegségkockázat közötti korreláció

A vizsgálatba bevont 72 infertilis férfi antropometriai adatait a 2. Táblázat mutatja be.

	Átlag	Tartomány
Életkor (év)	33,85	24–43
Testtömeg (kg)	90,43	60–135
Magasság (m)	1,80	1,61–2,00
BMI (kg/m ²)	27,94	19,15–49,22

2. Táblázat

A vizsgálatba bevont 72 férfi antropometriai adatai.

3.2. Ondóvizsgálat

Minden ondóminta levételére egy, a laboratórium közelében lévő privát helyiségben került sor, négynapos önmegtartóztatást követően, maszturbációval és egy tiszta műanyag tartályba történő ejakulálással, a WHO irányelveinek megfelelően [115]. A friss, kezeletlen minták cseppfolyósodását követően először a HBA-tesztet végeztük el a gyártó utasításait követve. Az ondóminták spermatológiai vizsgálatait, mint a spermiumszám, a motilitás, a morfológia, a vitalitás, stb. meghatározását a „WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen 5th edition” [115] utasításait pontosan betartva, azokat lépésről lépésre követve végeztük el, világos látóterű mikroszkópot (200-400-szoros nagyítás) és Makler-féle számlálókamrát használva, változatlan körülmények mellett (szobahőmérsékleten a cseppfolyósodott natív ondó 10 µl-es cseppjét felhasználva). Az eljárások alatt standard szobahőmérsékletet biztosítottunk, és mivel az ondóminták azonnal értékelésre kerültek, nem volt szükség a tárolásukra.

Az adatok gyűjtését és értelmezését szintén az ondóvizsgálatra vonatkozó WHO-kézikönyv előírásai szerint végeztük. A spermiumok mozgására vonatkozó kategóriák a következők voltak: progresszív motilitás (PR), ha a spermium aktívan mozog akár egyenesen, akár nagy ívű kört leírva, a sebességtől függetlenül; nem progresszív motilitás (NP), ha a spermium előrehaladás nélkül mozog; és immotilitás (IM), amely mozdulatlanságot jelent.

3.3. Hialuronsav-kötési assay (HBA[®])

A spermiumminőség funkcionális értékelését a kereskedelmi forgalomban kapható HBA[®]-teszttel végeztük (Biocoat Inc., USA). A tesztet a gyártó ajánlásai szerint végeztük el, 7–10 µl natív ondót cseppentetve a hialuronsavval bevont tárgylemezre, és 10-15 percnyi, szobahőmérsékleten történő inkubálás után meghatározva a spermiumok kötődési arányát.

3.4. Hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma (HB-MaSC)

A klasszikus spermiumparaméterek (spermiumsűrűség, motilitás, morfológia) és a HBA[®]-teszt eredményeinek kombinálásával a szerzők korábban leírtak egy új, a hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma” elnevezésű fertilitási mutatót, amely az egy ml ondóban található spermiumok számának, a progresszíven mozgó spermiumok százalékos arányának és a hialuronsavhoz kötődő, mozgó spermiumok percentilisének szorzatát adja meg [116], és amelyet a rendelkezésre álló adatokból kiszámítottunk.

3.5. Statisztikai elemzés

A BMI, illetve a HB-MaSC, a spermiumszám és a progresszív motilitás (WHO-PR, mely a WHO irányelveinek megfelelően mért értéket jelzi) eredményei közötti kapcsolatokat a testtömegre és az életkorra korrigált többszörös lineáris regressziót alkalmazva értékeltük. A változókat a normalitás növelése érdekében transzformáltuk: a HB-MaSC-nél és a spermiumszámnál négyzetgyök-transzformációt, a WHO-PR-nél négyzetes transzformációt, a BMI-nél természetes alapú logaritmikus transzformációt alkalmaztunk. A modell a log-BMI első, második és harmadik hatványon szereplő variánsait, illetve a testtömeg első és második hatványú variánsait tartalmazta, hogy lehetővé tegye görbületek jelenlétét az összefüggésben. A hatásokat marginális hatásokként fejeztük ki egységnyi növekedésre a BMI-tartomány referenciapontjaira specifikusan, 95%-os konfidencia-intervallumokkal és p-értékekkel.

A modellilleszkedéseket Breusch-Pagan/Cook–Weisberg-tesztekkel ellenőriztük heteroszkedaszticitásra, Ramsey-féle tesztel a regresszió specifikációs hibájára, illetve elvégeztük a maradékok és a maradékok-illesztett értékek görbék normalitásának vizsgálatát. A „Stata” statisztikai csomagot használtuk az adatok kezelésére és elemzésére. A 0,05-nél kisebb p-értékeket tekintettük a szignifikancia indikátorának. A követett eljárások összhangban voltak a humán kísérletekért felelős (intézményi) bizottság etikai normáival.

4. Eredmények

4.1. HBA-pontszám és HB-MaSC klinikailag infertilis férfiaknál

Kísérleteink azt tárták fel, hogy az andrológiai vizsgálatok 59,75%-ában (159-ből 95-ben) a betegeknél normozoospermiát találtunk, de a HBA% és a HB-MaSC-index értékei alacsonyabbak a publikált referencia értékeknél, ami kiemeli a jelen továbbfejlesztett módszer használatának fontosságát. A WHO ondóvizsgálatra vonatkozó kézikönyve (5. kiadás, 2010) alapján azokat tekintettük normozoospermiásnak, akiknél az ondótérfogat 1,5 ml fölött, a teljes spermiumszám 39×10^6 / ml fölött, a spermiumsűrűség legalább 15×10^6 / ml, a teljes motilitás több mint 40% és a progresszív motilitás több mint 32% volt. Az alábbi eredmények alapján a HB-MaSC a spermiumminőség változásainak érzékeny indikátora, és a mozgó spermiumok arányát is tükrözi.

4.2. A spermiumparaméterek, a HBA-pontszám és a HB-MaSC változásai kiegészítő kezelés után

Az átlagos spermiumsűrűség $36,55 \pm 1,82$ (átlag $\pm$ SEM – Standard Error of Mean, az átlag standard hibája) volt a kezeletlen csoportban ($N = 136$). A kezelt csoportban ($N = 39$), az első vizsgálatban az átlagos spermiumsűrűség (10^6 /ml) $24,95 \pm 2,91$ volt (átlag $\pm$ SEM) a kiegészítők szedésének elkezdése előtt, és a terápia után ez szignifikánsan $35,68 \pm 4,32$ -ra (átlag $\pm$ SEM) emelkedett ($p = 0,00805$) (3. Táblázat, 5. ábra).

A kezelt csoportban, az első vizsgálatban az átlagos HBA-arány (%) $38,71 \pm 3,12$ (átlag $\pm$ SEM) volt, és a kiegészítő terápia után ez $49,95 \pm 2,99$ -ra (átlag $\pm$ SEM) emelkedett. Statisztikailag szignifikáns emelkedést észleltünk a HBA-arányban ($p = 0,000004$) (3. Táblázat, 6. ábra).

A számított HB-MaSC-érték (10^6 /ml) $5,38 \pm 0,86$ (átlag $\pm$ SEM) volt az első vizsgálatban, és $11,47 \pm 1,93$ volt a kezelés után. Ebben az esetben is statisztikailag szignifikáns növekedést figyeltünk meg ($p = 0,000015$) (3. Táblázat).

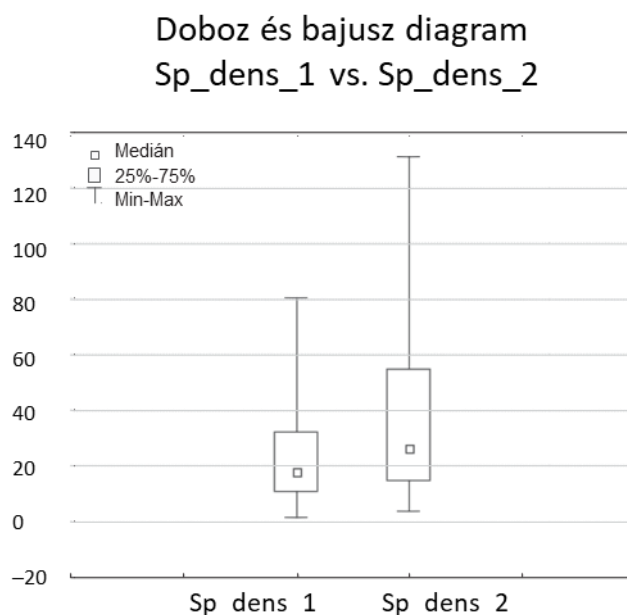
A kezelt betegeket telefonon is nyomon követtük 1,5-2 évvel a terápia után. 11 kezelt beteg (28,21%) partnere szült egészséges gyermeket asszisztált reprodukciós módszerek nélkül. További hét partner (17,95%) szült asszisztált reprodukciós technikák segítségével (intrauterin

inszemináció vagy intracitoplazmatikus spermiuminjekció). A kiegészítő kezelés következményeképpen tehát a korábban terméketlennek nyilvánított párok 46,15%-ánál született gyermek.

	Spermium-sűrűség ($10^6 / \text{ml}^{-1}$)	HBA-arány (%)	Számított HB-MaSC ($10^6 / \text{ml}^{-1}$)
Kezelés előtt	$24,95 \pm 2,91$	$38,71 \pm 3,12$	$5,38 \pm 0,86$
Kezelés után	$35,68 \pm 4,32$	$49,95 \pm 2,99$	$11,47 \pm 1,93$

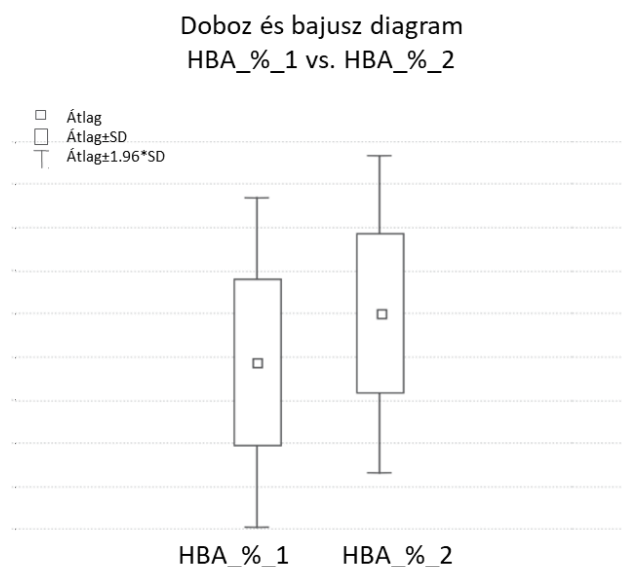
3. Táblázat

A kiegészítő terápiával kezelt csoport eredményei (N=39); az eredmények átlag $\pm$ SEM formában láthatók



5. ábra:

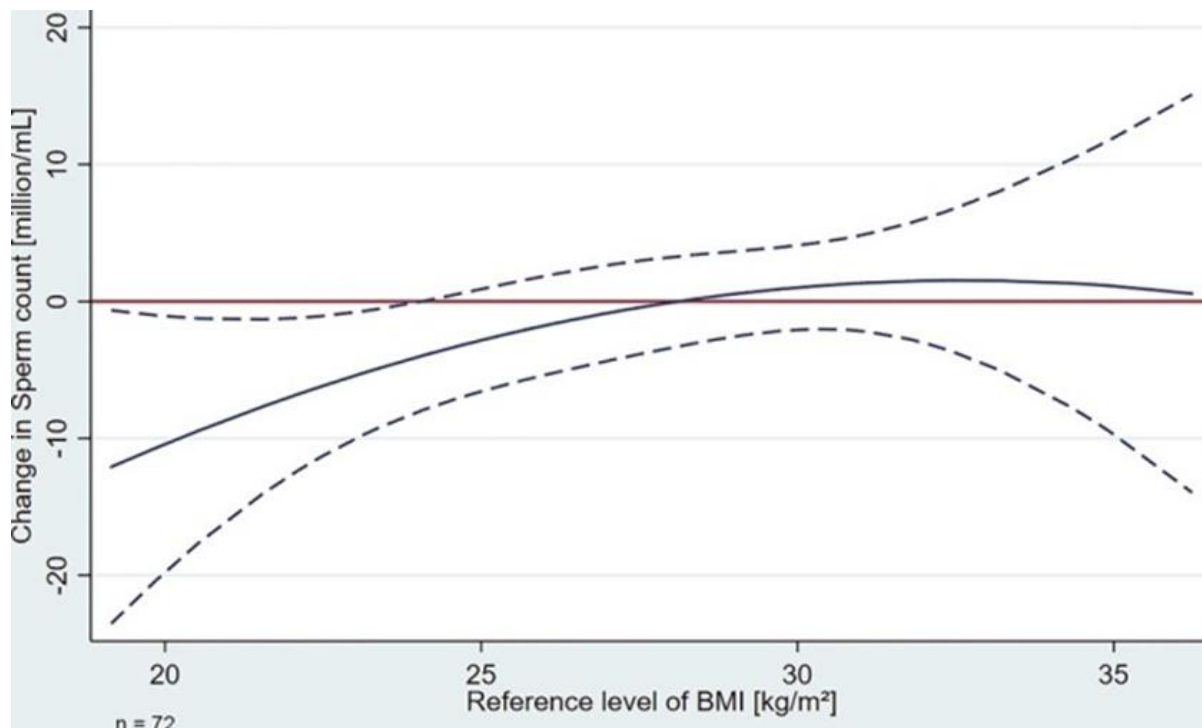
*Spermiumsűrűség a kiegészítő terápia előtt (Sp_dens_1) és után (Sp_dens_2) ($10^6/\text{ml}$).
(box and whisker plot)*



6. ábra:
A HA-kötés (HBA %) változása a kiegészítő terápia után (HBA_%_1:
a terápia előtt; HBA_%_2: a terápia után).
(box and whisker plot)

4.3. Hialuronánhoz kötődő érett spermiumok számának (HB-MaSC) korrelációja a testtömegindexszel (BMI)

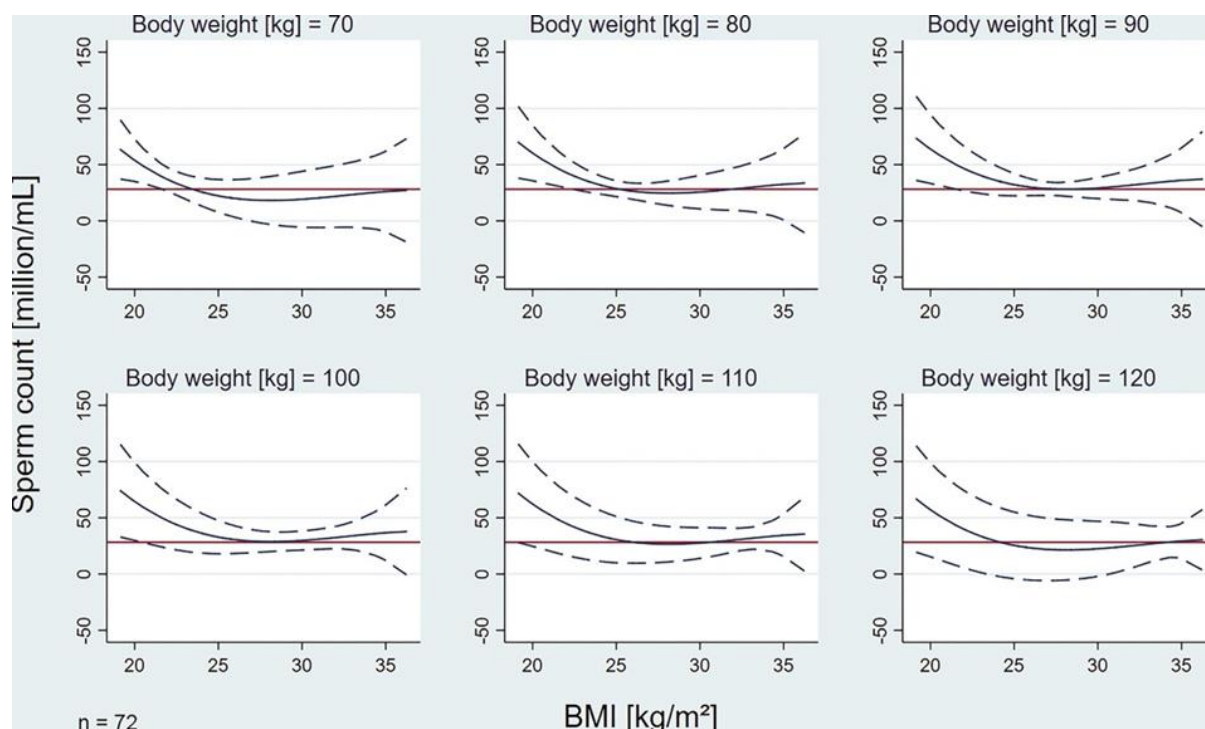
A második vizsgálatban, a hialuronánhoz kötődő érett spermiumok számának (HB-MaSC) és a BMI korrelációjának vizsgálatakor a spermiumszám életkorra és a testtömegre korrigált, regresszióval illesztett értékeit a legmagasabbaknak a normális BMI-tartomány alsó végénél találtuk. A spermiumszám értékei szignifikánsan csökkentek a BMI növekedésével 25 kg/m²-ig, de ezen BMI-érték fölött figyelemre méltó változásokat nem azonosítottunk, mivel a spermiumszám nem szignifikáns mértékben változott egy konstans módon alacsony, 30 millió/ml-es szint körül (7. és 8. ábra). Ez azt jelzi, hogy a túlsúlyostól az elhízott tartományig terjedő BMI alacsonyabb spermiumszámmal társul a normális BMI-tartomány közepéhez közeli alanyokéhoz képest. Az összefüggés a 90 kg körüli testtömegig terjedően a legmegalapozottabb, de az ennél nehezebb alanyoknál, akik a mintánkban általánosan a normális BMI-tartományon kívül estek, már nem teljesül (8. ábra).



7. ábra: A testtömegindex (BMI) egységnyi növekedésének marginális hatása a spermiumszám változásának várható értékére.

A BMI és a spermiumszám változásának összefüggéseit a testtömegre és az életkorra korrigált többszörös lineáris regresszió alkalmazásával értékeltük. A spermiumszám-változás szignifikánsan negatív értékei láthatók az alacsonyabb BMI-értékeknél. ($n = 72$)

A „Stata” statisztikai szoftverben a modellt, az illeszkedéseket Breusch–Pagan/Cook–Weisberg-tesztekkel ellenőriztük heteroszkedaszticitásra, Ramsey-féle teszttel a regresszió specifikációs hibájára, illetve elvégeztük a maradékok és a maradékok–illesztett értékek görbék normalitásának vizsgálatát. A görbék 95%-os konfidencia-intervallummal (szaggatott vonalak) határozzák meg a marginális hatás pontbecslését (folytonos vonal) a BMI vízszintes tengelyen olvasott referenciaszintjein. A becslések (folytonos vonal) szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérnek minden értéktől, amely a 95%-os konfidencia-intervallumon (a két szaggatott vonal közötti terület) kívül esik.

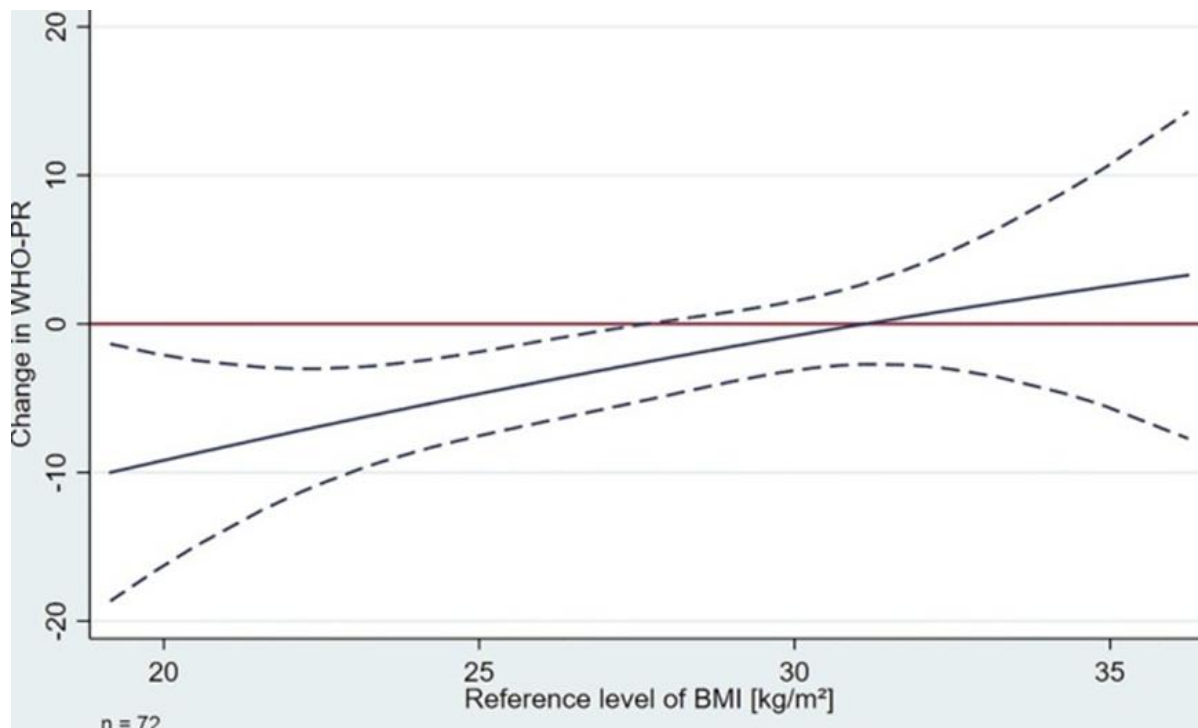


8. ábra: A testtömegindex (BMI) és a spermiumszám várható értéke közötti kapcsolat.

A BMI és a spermiumszám összefüggéseit a testtömegre és az életkorra korrigált többszörös lineáris regresszió alkalmazásával értékeltük. Kisebb testtömegnél van néhány alacsony BMI-érték, ahol a spermiumszám szignifikánsan eltér pozitív irányban a mintaátlagtól (vízszintes vonal), azonban magasabb BMI-értékeknél a spermiumszám értékei nem érik el a fiziológias szintet, és megállapodnak az alacsony mintaátlag körül a testtömegtől függetlenül. ($n = 72$)

A „Stata” statisztikai szoftverben a modellilleszkedéseket Breusch–Pagan/Cook–Weisberg-tesztekkel ellenőriztük heteroszkedaszticitásra, Ramsey-féle teszttel a regresszió specifikációs hibájára, illetve elvégeztük a maradékok és a maradékok-illesztett értékek görbék normalitásának vizsgálatát. A görbék 95%-os konfidencia-intervallummal (szaggatott vonalak) határozzák meg az illesztett értékeket (folytonos vonal) az életkor mintaátlagán, különböző testtömegszinteken, amelyeket minden képzetét fölött feltüntettünk; a vízszintes vonal az illesztett értéket jelöli az összes magyarázó változó mintaátlagán. Az illesztett értékek (folytonos vonal) szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérnek minden értéktől, amely a 95%-os konfidencia-intervallumon (a két szaggatott vonal közötti terület) kívül esik.

Hasonló tendenciákat észleltünk a progresszíven mozgó spermiumok arányában (WHO-PR) [115], amely szignifikánsan csökkent a BMI emelkedésével a normálistól a túlsúlyosig terjedő BMI-tartományban (9. ábra), mielőtt kiegyenlített szintre ért az elhízott alanyokban. Az életkorra és a BMI-re korrigálva, a 70-90 kg-os tartományban a nagyobb testtömeg növelő hatással volt a WHO-PR-re, 17,7 becsült százalékponttal ($p < 0.0001$) az azonos életkorú és BMI-vel rendelkező 80 kg-os alanyoknál a 70 kg-osokhoz képest, illetve 11,3 százalékponttal ($p = 0.0003$) az azonos életkorú és BMI-jű 90 kg-os alanyoknál a 80-kg-osokhoz képest (10. ábra). A WHO-PR-en kívül más eredménynél nem volt megfigyelhető szignifikáns összefüggés a testtömeggel.

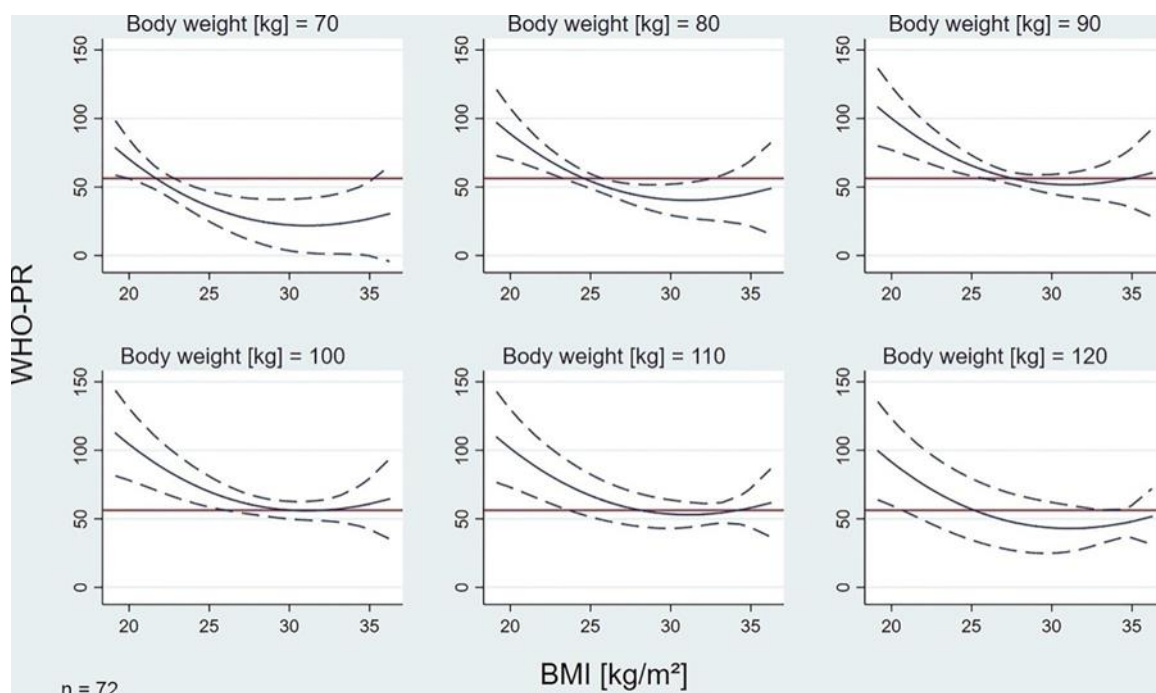


9. ábra: A testtömegindex (BMI) egységnyi növekedésének marginális hatása a progresszív motilitás (a WHO irányelveinek megfelelően mérve) (WHO-PR) változásának várható értékére.

10.

A BMI és a WHO-PR változásának összefüggéseit a testtömegre és az életkorra korrigált többszörös lineáris regresszió alkalmazásával értékeltük. A WHO-PR változásának szignifikánsan negatív értékei láthatók az alacsonyabb BMI-értékeknél. ($n = 72$)

A „Stata” statisztikai szoftverben a modellilleszkedéseket Breusch–Pagan/Cook–Weisberg-tesztekkel ellenőriztük heteroszkedaszticitásra, Ramsey-féle teszttel a regresszió specifikációs hibájára, illetve elvégeztük a maradékok és a maradékok–illesztett értékek görbék normalitásának vizsgálatát. A görbék 95%-os konfidencia-intervallummal (szaggatott vonalak) határozzák meg a marginális hatás pontbecslését (folytonos vonal) a BMI vízszintes tengelyen olvasott referenciaszintjein. A becslések (folytonos vonal) szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérnek minden értéktől, amely a 95%-os konfidencia-intervallumon (a két szaggatott vonal közötti terület) kívül esik.



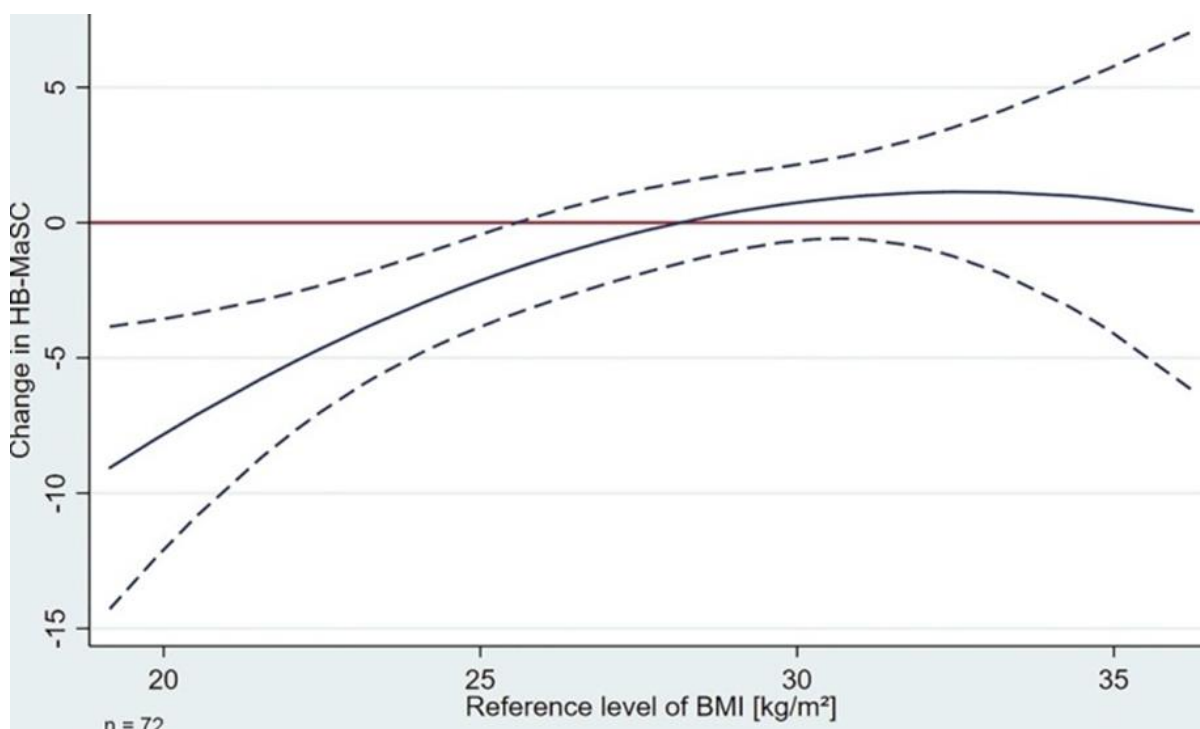
11. ábra: A testtömegindex (BMI) és a progresszív motilitás (a WHO irányelveinek megfelelően mérve) (WHO-PR) várható értéke közötti kapcsolat.

A BMI és a WHO-PR összefüggéseit a testtömegre és az életkorra korrigált többszörös lineáris regresszió alkalmazásával értékeltük. Alacsony BMI-értékeknél (a testtömegtől függetlenül) a WHO-PR értékei magasabbak lehetnek a mintaátlagnál, azonban a BMI emelkedésével a WHO-PR értékei alacsonyabbnak mutatkoznak, és általánosságban nem térnek el szignifikánsan az alacsony mintaátlagtól. Viszont például 80 kg-os testtömegnél és 28–30 kg/m² BMI-nél a WHO-PR értékei szignifikánsan negatív irányban térnek el a mintaátlagtól. (n = 72)

A „Stata” statisztikai szoftverben a modellilleszkedéseket Breusch–Pagan/Cook–Weisberg-tesztekkel ellenőriztük heteroszkedaszticitásra, Ramsey-féle teszttel a regresszió specifikációs hibájára, illetve elvégeztük a maradékok és a maradékok-illesztett értékek görbék normalitásának vizsgálatát. A görbék 95%-os konfidencia-intervallummal (szaggatott vonalak) határozzák meg az illesztett értékeket (folytonos vonal) az életkor mintaátlagán, különböző testtömegszinteken, amelyeket minden képzetét fölött feltüntettünk; a vízszintes vonal az illesztett értéket jelöli az összes magyarázó változó mintaátlagán. Az illesztett értékek (folytonos vonal) szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérnek minden értéktől, amely a 95%-os konfidencia-intervallumon (a két szaggatott vonal közötti terület) kívül esik.

Az életkorra és a testtömegre korrigált összefüggés a BMI + a HB-MaSC változása között (11. ábra) hasonló tulajdonságokat mutat, mint a BMI + spermiumszám-változás lineáris regressziós elemzése. A HB-MaSC értékei magasabbnak bizonyultak alacsonyabb BMI-értékeknél, és egyenletesen csökkentek 25 kg/m² BMI-ig. Ez a csökkenés még meredekebb volt, mint amit a spermiumszámnál láttunk, ami azt sugallja, hogy a BMI + HB-MaSC összefüggés érzékenyebben szemlélteti a BMI hatását. 25 kg/m² BMI fölött nem láttunk további csökkenést

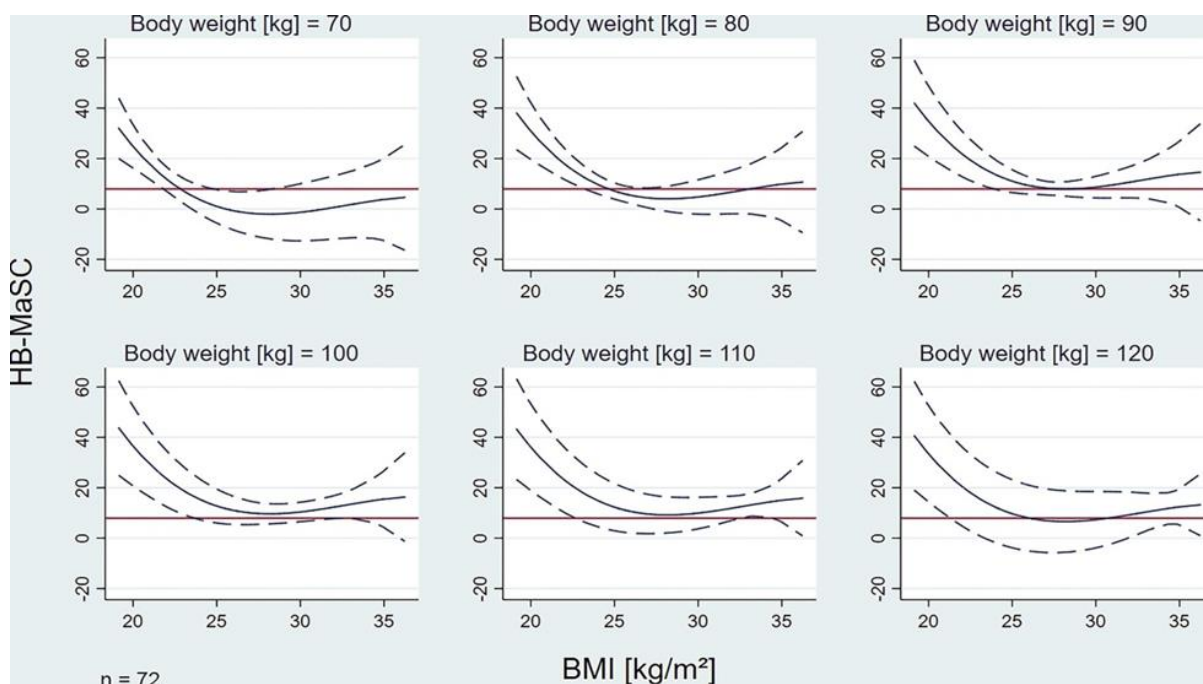
a HB-MaSC-indexben, amely alacsony szinten maradt, ami jellemzőnek bizonyult a túlsúlyostól az elhízottig terjedő BMI-tartományra. Úgy tűnik, a testtömeg nincs olyan szoros kapcsolatban e mutató változásaival, mint a BMI. Bár a 70–100 kg-os tartományban a nagyobb testtömeg mutatott valamelyes tendenciát arra, hogy növelő hatást fejtsen ki a HB-MaSC-re, azonban ez statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. A BMI és HB-MaSC közötti összefüggés 100 kg körüli testtömegig a legmegalapozottabb (12. ábra).



12. ábra: A testtömegindex (BMI) egységnyi növekedésének marginális hatása a hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma (HB-MaSC) változásának várható értékére.

A BMI és a HB-MaSC változásának összefüggéseit a testtömegre és az életkorra korrigált többszörös lineáris regresszió alkalmazásával értékeltük. A HB-MaSC változásának szignifikánsan negatív értékei láthatók az alacsonyabb BMI-értékeknél. ($n = 72$)

A „Stata” statisztikai szoftverben a modellilleszkedéseket Breusch–Pagan/Cook–Weisberg-tesztekkel ellenőriztük heteroszkedaszticitásra, Ramsey-féle teszttel a regresszió specifikációs hibájára, illetve elvégeztük a maradékok és a maradékok–illetett értékek görbék normalitásának vizsgálatát. A görbék 95%-os konfidencia-intervallummal (szaggatott vonalak) határozzák meg a marginális hatás pontbecslését (folytonos vonal) a BMI vízszintes tengelyen olvasott referenciaszintjein. A becslések (folytonos vonal) szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérnek minden értéktől, amely a 95%-os konfidencia-intervallumon (a két szaggatott vonal közötti terület) kívül esik.



13. ábra: A testtömegindex (BMI) és a hialuronánhoz kötődő érett spermiumok számának (HB-MaSC) várható értéke közötti kapcsolat.

A BMI és a HB-MaSC összefüggéseit a testtömegre és az életkorra korrigált többszörös lineáris regresszió alkalmazásával értékeltük. Alacsony BMI-értékeknél (a testtömegtől függetlenül) a HB-MaSC értékei magasabbak lehetnek a mintaátlagnál, azonban a BMI emelkedésével a HB-MaSC értékei alacsonyabbnak mutatkoznak, és a testtömegtől függetlenül nem térnek el szignifikánsan az alacsony mintaátlagtól. ($n = 72$)

A „Stata” statisztikai szoftverben a modellilleszkedéseket Breusch–Pagan/Cook–Weisberg-tesztekkel ellenőriztük heteroszkedaszticitásra, Ramsey-féle teszttel a regresszió specifikációs hibájára, illetve elvégeztük a maradékok és a maradékok–illesztett értékek görbék normalitásának vizsgálatát. A görbék 95%-os konfidencia-intervallummal (szaggatott vonalak) határozzák meg az illesztett értékeket (folytonos vonal) az életkor mintaátlagán, különböző testtömegszinteken, amelyeket minden képzetét fölött feltüntettünk; a vízszintes vonal az illesztett értéket jelöli az összes magyarázó változó mintaátlagán. Az illesztett értékek (folytonos vonal) szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérnek minden értéktől, amely a 95%-os konfidencia-intervallumon (a két szaggatott vonal közötti terület) kívül esik.

A modellilleszkedést minden esetben megfelelőnek találtuk, elfogadható mértékű, kisebb eltérésekkel a maradékok normalitásától a HB-MaSC-, a spermiumszám- és a WHO-PR-modellekénél; egyéb modellellenőrző módszerekkel nem találtuk gyenge illeszkedés bizonyítékát semmilyen kimenetelre.

5. Megbeszélés

Korábban bebizonyosodott, hogy a morfológián alapuló, egyszerű spermatológiai vizsgálatok nem elégségesek az asszisztált reprodukív technikák új követelményeinek kielégítésére. Következésképpen napjainkban egyre inkább megkérdőjeleződött a konvencionális spermatológiai vizsgálatok értéke a termékenységi állapot megítélésében [118].

A hyaluronsav-kötési assay (HBA[®]) az egyik újonnan bevezetett vizsgálat, amely lehetővé teszi a spermiumok funkcionális vizsgálatát. A HBA[®]-teszt elméleti alapja az, hogy csak az érett, aneuploiditást és DNS-fragmentációt csak kis gyakorisággal mutató spermiumok expresszálnak hyaluronsav kötő receptorokat (HBR), és csak ezek tudnak a cumulus-sejtek hyaluronsavat (HA, más néven hialuronán) tartalmazó poliszacharid mátrixához kapcsolódni [101,119,120]. Ennélfogva, csak az érett spermiumok képesek in vitro a hyaluronsavval kezelt felszínhez kapcsolódni a HBA-tesztekben – mint in vivo a zona pellucidához –, ami lehetővé teszi az érett és az éretlen sejtek megkülönböztetését [97,99].

A spermiumok érettsége, az alacsony aneuploiditási és DNS-fragmentációs arány, a kromatin megnövekedett integritása, a normális fejmorfológia és következésképpen a jobb megtermékenyítő-képesség mind korrelál a hyaluronsav-kötési képességgel [91,101]. A HA-alapú spermiumszelekció növeli a beágyazódási rátát, és csökkenti az ICSI-t követő korai vetélések arányát, kiváltképp a spermiumok csökkent HA-kötő képessége esetén [105]. A hyaluronsav-kötési assay hasznos továbbá oligozoospermianál is, mivel segítséget nyújt a későbbi IVF technikák közötti választásban.

Eredményeink alapján meg vagyunk győződve arról, hogy a HBA-analízis és az abból származtatott mutató (HB-MaSC) egy objektív, standardizálható teszt, amely a megtermékenyítő-képesség egy jobb megközelítését nyújtja, mivel tükrözi a mozgó spermiumok arányát is. Úgy gondoljuk, ez a továbbfejlesztett paraméter az, ami megadja a funkcionáló, érett spermiumoknak ondómintában lévő valódi számát. A HBA-analízis fontos diagnosztikai eszköz lehet normozoospermia mellett jelentkező infertilitás esetében is. Ez a vizsgálat lehetővé teszi, hogy a morfológiai assay-vel korábban tévesen normálisnak ítélt abnormális mintákat felismerjük, és sokkal mérhetőbbé teszi a terápia hatékonyságát is. Mindemellett a vizsgálat segítséget nyújt az infertilitás területén dolgozó szakembereknek az inszemináció és az IVF/ICSI közötti választásban, hogy a legjobb eséllyel ériék el a sikeres

reprodukción. A szerzők úgy vélik, hogy a HB-MaSC-index alkalmazása pontosabban írhatja le a férfiak megtermékenyítő-képességét, mint a korábban használt klasszikus paraméterek, és ez egy potenciálisan hasznos eszköz az andrológus kezében a mindennapi andrológiai gyakorlatban és az asszisztált reprodukív technikákat megelőzően. Ugyanezen tanulmányunk azt is kimutatta, hogy a taurint, magnéziumot, karnitint, arginint, C-vitamint, E-vitamint, Q10-koenzimet, cinket, béta-karotint, B6-vitamint, folsavat, szelént, B12-vitamint és D3-vitamint tartalmazó komplex étrend-kiegészítők előnyösek lehetnek a férfiak infertilitásának kezelésében. A vonatkozó irodalom többségének megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a spermiumok száma és a sikeres megtermékenyítés képessége szignifikáns javulást mutatott a komplex kiegészítő terápiának köszönhetően.

Második tanulmányunk célja a BMI konvencionális ondóparaméterekre (spermiumkoncentráció és progresszív motilitás) és a hialuronán-kötésen alapuló megtermékenyítő-képességre gyakorolt hatásának vizsgálata és összehasonlítása volt.

A közelmúltban kimutatták, hogy a spermiumok funkcionális vizsgálata fontos lehet a klinikai infertilitás azonosításában [118], a BMI-nek a spermiumok funkcionális jellemzőire kifejtett hatásáról azonban kevés kísérleti adat áll rendelkezésre. Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a BMI hatását az említett konvencionális spermiumparaméterekre és a hialuronán kötésen alapuló megtermékenyítő-képességre, 72 infertilis férfi adatait testtömegre és életkorra korrigált többszörös lineáris regressziós elemzésekkel feldolgozva.

Bár igazoltak bizonyos kapcsolatot a BMI és a férfiak infertilitása között [24,25], a BMI és az ondóparaméterek között nem feltétlenül áll fenn ilyen egyértelmű összefüggés: korábbi klinikai tanulmányok ellentmondásos eredményeket közöltek a túlsúlyosság spermiumszámra kifejtett hatásáról. Nguyen és mtsai. tanulmánya szerint lehet valamilyen összefüggés a férfiak infertilitása és a BMI között, mivel az elhízott férfiaknál a normális BMI-vel rendelkezőkhöz képest az oligospermia 3,5-szeres valószínűségét figyelték meg, megerősítve ezzel a BMI negatív hatását a férfiak fertilitására [121]. Sermondade és mtsai. 21 tanulmány metaanalízisét készítették el, mely szerint a túlsúlyosság és az elhízás az azoospermia vagy az oligospermia fokozott előfordulásával társult, továbbá köztük J alakú összefüggés állt fenn [122].

Ennek ellentmond viszont, hogy számos klinikai tanulmány megkérdőjelezi a közvetlen kapcsolatot a szubfertilitás és az elhízás között. Chavarro és mtsai. például azt állapították meg, hogy megnövekedett testtömegnél a reprodukív hormonok szintjében meglévő jelentős különbségek ellenére csak a szélsőséges mértékű elhízás ($BMI \geq 35 \text{ kg/m}^2$) befolyásolta

negatívan a spermiumszámot és a mozgási paramétereket [123]. Ugyanakkor MacDonald és mtsai. sem találtak bizonyítékot az emelkedett BMI és az ondóparaméterek kapcsolatára [33].

Ezzel ellentétben saját eredményeink szerint a megnövekedett BMI (25 kg/m^2) (7. és 8. ábra) negatív hatással van a spermiumszámra, maga a testtömeg viszont nem (8. ábra). A progresszív motilitás esetében a megnövekedett BMI negatív hatását figyeltük meg a WHO-PR-re is (9. és 10. ábra). Úgy tűnik viszont, hogy a nagyobb testtömeg kevésbé kifejezett csökkentő hatással van a WHO-PR-re – ha összehasonlítjuk a 70-100 kg-os tartomány görbéit (4. ábra) –, azonban a még nagyobb testtömegeknél (100 kg fölött) a negatív hatások erősödnek (igaz, nem szignifikánsan). Habár ugyanaz a tendencia látható mind a spermiumszám és testtömeg, mind a HB-MaSC és testtömeg összefüggéseiben is, az emelkedő testtömeg szignifikánsan gyengülő hatása a WHO-PR csökkenésére izolált esetnek bizonyult: a WHO-PR-en kívül más eredménynél nem figyelhető meg szignifikáns összefüggés a testtömeggel. Megállapítottuk, hogy a BMI emelkedésének negatív hatása a spermiumok minőségére $28\text{--}30 \text{ kg/m}^2$ fölött platót ér el, mivel a spermiumkoncentráció, a mozgásképeség és a hialuronánhoz való kötődés nem csökken tovább e BMI-érték fölött.

Kísérletünkben a progresszív motilitás viszont összefüggést mutatott a BMI-vel, azonban ez a kapcsolat ellentmondásos a tudományos irodalomban, mint azt már említettük a BMI és spermiumszám esetében. Ramaraju és mtsai. egy közelmúltbeli cikkükben egy számítógéppel segített spermiumanalízis eredményeit tárgyalják, aminek végső megállapítása az, hogy az elhízás ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) alacsonyabb progresszív motilitással társul [124]. Ezzel szemben Keskin és mtsai. egy hasonló vizsgálata az ilyen jellegű összefüggés igazolása nélkül zárult, ugyanakkor kimutatták, hogy a BMI negatívan korrelál a prolaktin- és a tesztoszteronszinttel [125].

A legújabb kutatások azt mutatták, hogy bár a BMI-nek van egy általános hatása az in vitro fertilizáció sikerére, az nem befolyásolja a terhességi arányt az intracitoplazmatikus spermiuminjekció ciklusaiban [126]. Az asszisztált reprodukciós technikák eredményeit illetően Thomsen és mtsai. azt állapították meg, hogy a fertilizációs rátát, a jó minőségű embriók számát, a beágyazódási arányt és a terhesség kimenetelét nem befolyásolta a férfiak BMI értéke [127]. Nem találtak továbbá semmilyen, a BMI által a konvencionális ondóparaméterekre kifejtett hatást sem.

A spermiumok funkcionális vizsgálatára ezért számos új tesztet kellett kutatásba vonni, mivel

a klasszikus spermatológiai vizsgálatok elégtelennek bizonyultak a férfiak fertilitásának megítélésében. Az elhízás férfifertilitásra gyakorolt hatását jobban megmagyarázhatjuk a BMI és a spermiumok funkcionális változói közötti összefüggés vizsgálatával, mint a konvencionális ondóparaméterekkel.

A hyaluronsav-kötési assay egy viszonylag új funkcionális teszt a spermium megtermékenyítő-képességének értékelésére [116]. Mindazonáltal korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre a túlsúlyosság és a spermiumok hialuronán-kötési kapacitásának kapcsolatáról. Sermondade és mtsai. felmérték a kapcsolatot a férfiak BMI-je, a konvencionális ondóparaméterek és a zona pellucidához való kötődés képessége között, és nem találtak korrelációt [32]. Ugyanakkor Wegner és mtsai. kimutatták, hogy a dohányzás és az abnormálisan magas BMI együttesen alacsonyabb hialuronán-kötési kapacitással társul [128]. Az eredményeink szemléltették, hogy a magas BMI önmagában is hozzájárulhat a férfiak infertilitásához, hiszen az emelkedő BMI negatív hatással van a spermium hialuronán-kötési kapacitására, még akkor is, ha ez 25 kg/m^2 fölött stabilizálódni kezd egy állandó, alacsony szinten. A testtömegindex előnyös jelölt lehet a HBA-eredményekkel való összevetésre, ellentétben a testtömeggel, amelynek esetében az előbbi összefüggés kísérletünkben nem bizonyult jól megalapozottnak. Még jobb, ha a BMI-t egy, a HA-kötési eredményekkel kapcsolatos másik mutatóval vetjük össze, a HB-MaSC index-el, amelyet a szerzők vezettek be korábban [116] a konvencionális és a funkcionális spermiumparaméterek kombinált értelmezéseként, mely jelentősen javíthatja a klinikai felhasználást. Ez az újonnan leírt fertilitási mutató figyelembe veszi a spermiumsűrűséget, a progresszív motilitást és a HA-kötési képességet, hiszen az elegendő számú mozgó spermium előfeltétele a HA-kötésnek. E paraméter használatával a jelen tanulmányban azt mutattuk ki, hogy a testtömeg figyelmen kívül hagyása után a megnövekedett BMI hatása a spermiumok minőségére még kifejezettebb, ha a HB-MaSC-t vesszük figyelembe.

Az elhízás spermatogenezisre és a here működésére gyakorolt negatív hatásának háttérmechanizmusait számos kutató vizsgálta. A spermiumokra ható fokozott oxidatív stressz [17,26], a hormonok vagy a velük kapcsolatos fehérjék (tesztoszteron, ösztrogén, leptin, SHBG, aromatáz enzim) megváltozott koncentrációján [123,129-133], molekuláris folyamatok (például metiláció, acetiláció, illetve változások az RNS és a kis nem-kódoló RNS szintjében) [129], vagy akár a herék túlsúlyosság miatt emelkedett hőmérséklete is mind kapcsolatban lehetnek a fertilitási állapotot befolyásoló elhízással [134].

A férfiak infertilitásának bizonyosan soktényezős, a környezettel és az életmóddal kapcsolatos

etiológiája van, amelyek mind módosíthatják a túlsúlyosság hatását. Jelen tanulmányunknak van néhány korlátja. Miután az adatgyűjtést egy andrológiai járóbeteg-rendelőben végeztük, korlátozott adatok állnak rendelkezésre a női fertilitási faktorokról. Mivel a rutin andrológiai vizsgálat csak súlyos pathozoospermia vagy hereelégtelenség esetén tartalmaz hormonmeghatározást, a reprodukív hormonok szintje és a HBA vagy a BMI közötti kapcsolatot ez a tanulmány nem vizsgálta.

Következtetésként elmondható, hogy a jelen tanulmány legjobb ismereteink szerint első alkalommal nyújt elemzést az elhízásnak a spermiumok hialuronán-kötési képességére gyakorolt hatásáról a nem dohányzó, infertilis férfiak körében. Eredményeink azt sugallják, hogy a testtömeg változásainak hatása a hialuronán-kötésre kisebb, mint a testtömeg indexé, azaz a BMI növekedése önmagában (azaz dohányzás nélkül) jobban korrelál az infertilitással, mint a testtömeg növekedése, ami újdonság. Eredményeink képviselik a BMI és HB-MaSC korreláció első bemutatását. Ez a kapcsolat nemcsak jól korrelál a BMI-spermiumszám összefüggéssel, de némileg érzékenyebbnek is bizonyult a BMI növekedésére.

Még előnyösebb, hogy a számítási módszerünk figyelembe veszi a spermiumok funkcionalitását, mivel egyszerre használja a spermiumsűrűség, a progresszív motilitás és a HA-kötési kapacitás értékeit, így további információt biztosít. A HB-MaSC határozottabb összefüggést tükröz az elhízás és az infertilitás között, mint a testtömeg vagy a klasszikus spermatológiai mutatók. Így a tudományos irodalomban a spermiumszám és a motilitás összefüggéseivel kapcsolatban fellelhető ellentmondások ellenére a HB-MaSC mutató alkalmazását javasoljuk, amely a konvencionális és a funkcionális spermiumparamétereket kombinálva segít a fertilitási állapot értékelésében.

6. Összefoglalás

A klasszikus spermatológiai vizsgálat gyors, költséghatékony, de számos mai eljáráshoz nem ad lényegi információt, a funkcionális tesztek pedig főleg az in vitro megtermékenyítés szempontjából vizsgálják a megtermékenyítő képességet. Mivel a spermiumsűrűsége szükséges van a kezelési stratégiákhoz, és a motilitás befolyásolja a HA-kötési kapacitást, azt feltételezzük, hogy a mindennapi andrológiai gyakorlatban a HBA-eredmény egyszerűen önmagában, a spermiumsűrűség és a progresszíven mozgó spermiumok arányának ismerete nélkül nem biztosít elégséges információt a férfiak fertilitásának megítéléséhez. Az eddig használt paramétereket (spermiumsűrűség, motilitás, morfológia) és a HBA[®] teszt eredményeit kombinálva gyakorlati szempontból hasznosnak találtuk, hogy ezeket az adatokat egy mutatóba rendezzük össze. Ezt a mutatót HB-MaSC-nek (Hyaluronan Bound Matured Sperm Count, hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma) nevezzük, amely az egy ml ondóban található spermiumok számának, a progresszíven mozgó spermiumok százalékos arányának és a hialuronsavhoz kötődő, mozgó spermiumok percentilisének szorzatát adja meg.

Eredményeink alapján meg vagyunk győződve arról, hogy a HBA-analízis és az abból származtatott mutató (HB-MaSC) egy objektív, standardizálható teszt, amely a megtermékenyítő-képesség egy jobb megközelítését nyújtja, mivel tükrözi a mozgó spermiumok arányát is. Úgy gondoljuk, ez a továbbfejlesztett paraméter az, ami megadja a funkcionáló, érett spermiumoknak az ondómintában lévő valódi számát, emiatt ennek az indexnek a bevezetését javasoljuk a mindennapi andrológiai gyakorlatban is.

Mivel ez az új index jó korrelációt mutat a spermiumokat ért károsító tényezőkkel is, javasoljuk ezen index alkalmazását az andrológiai kutatások során is.

A taurint, magnéziumot, karnitint, arginint, C-vitamint, E-vitamint, Q10-koenzimet, cinket, béta-karotint, B6-vitamint, folsavat, szelént, B12-vitamint és D3-vitamint tartalmazó komplex étrend-kiegészítők alkalmazása előnyös lehet a férfiak infertilitásának kezelésében. A vonatkozó irodalom többségének megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a spermiumok száma és a sikeres megtermékenyítés képessége szignifikáns javulást mutatott a komplex kiegészítő terápiának köszönhetően, emiatt indokolt esetben azok alkalmazását javasoljuk az andrológiai gyakorlatban.

7. Summary

Conventional spermatological examinations are cost-effective and quick to perform, but do not provide substantial information for many of today's procedures, while functional tests examine fertility primarily from the perspective of in vitro fertilization. As sperm density is required for treatment strategies and motility affects HA binding capacity, we assume that in everyday andrological practice, the HBA score alone—without knowledge of sperm density and the proportion of progressively moving spermatozoa—does not provide sufficient information to assess male fertility. We found it practically useful to organize the data from the parameters already in use (sperm density, motility, morphology) and the results of the HBA[®] test into one index. We call this index HB-MaSC (Hyaluronan Bound Matured Sperm Count), which stands for the product of the number of spermatozoa in 1 ml semen, the percentage of progressively motile sperm and the percentile of moving spermatozoa binding to hyaluronic acid.

Based on our results, we are convinced that HBA analysis and the index derived from it (HB-MaSC) is an objective, standardisable test that provides a better approach to fertility potential, as it also reflects the proportion of motile sperm. We believe that this improved parameter is the one that provides the true number of functioning, matured spermatozoa in one ml semen sample, therefore, we recommend the introduction of this index in everyday andrological practice.

As this new index also shows a good correlation with sperm-damaging factors, we recommend the use of this index in andrological research as well.

Complex dietary supplements containing taurine, magnesium, carnitine, arginine, vitamin C, vitamin E, coenzyme Q10, zinc, beta-carotene, vitamin B6, folic acid, selenium, vitamin B12 and vitamin D3 may be beneficial in the treatment of male infertility. In line with the majority of relevant literature, we have found that sperm count and the ability of successful fertilization showed significant improvement due to the complex supplement therapy, therefore—where appropriate—we recommend their use in andrological practice.

8. Rövidítések jegyzéke

AZF	azoospermia faktor (Azoospermia Factor Region)
BMI	testtömegindex (Body Mass Index)
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)
CBAVD	vas deferens veleszületett kétoldalú hiánya (Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens)
CUAVD	vas deferens veleszületett egyoldalú hiánya (Congenital Unilateral Absence of the Vas Deferens)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)
DTT	ditiotritol
DNS	dezoxiribonukleinsav
FSH	follikulusstimuláló hormon
HA	hyaluronsav (Hyaluronic Acid)
HBA [®]	hyaluronsav-kötési assay (Hyaluronan Binding Assay)
HB-MaSC	hyaluronsavhoz kötődő érett hímivarsejt szám (Hyaluronan Bound Matured Sperm Count)
HBR	hyaluronsav kötő receptor (Hyaluronan Binding Receptor)
HCG	humán chorion gonadotropin
HMG	humán menopauza gonadotropin
HOST	Hypo-osmotic Swelling Test
HspA2	70 kDa hősokk fehérje (Heat shock-related 70 kDa protein 2)

ICSI	intracytoplazmatikus spermium injektálás (Intracytoplasmic Sperm Injection)
IM	immotilitás
IVF	in vitro fertilizáció (In Vitro Fertilization)
MESA	spermium mikrosebészeti epididimális aspirációja (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration)
Micro-TESE	spermium mikrosebészeti mintavétel heréből (Microsurgical testicular sperm extraction)
NP	nem progresszív motilitás
OAT	oligo-astheno-teratozoospermia
PICSI	Physiological ICSI (intracytoplazmatikus spermiuminjekcióra kiválasztással (picked for ICSI) a lehető legfiziológiásabb (legalkalmasabb) spermium beültetése
PR	progresszív motilitás
r-h FSH	rekombináns humán FSH (recombinant human FSH)
ROS	reaktív oxigén gyökök (Reactive Oxygen Species)
SCD teszt	spermium kromatin diszperziós teszt
SCO	Sertoli cell only
SEM	az átlag standard hibája (Standard Error of Mean)
SHBG	nemihormon-kötő fehérje (Sex Hormone Binding Globulin)
SPA	spermium-penetrációs vizsgálat (Sperm Penetration Assay)
TESE	spermium sebészeti mintavétel heréből (Testicular Sperm Extraction)
TEX 11	herében kifejeződve 11 (Testis Expressed 11)

TURED	ejaculatorius ductusok transurethralis rezekciója (Transurethral Resection of the Ejaculatory Ducts)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
WHO-PR a	WHO irányelveinek megfelelően mért progresszív motilitás
ZP	zona pellucida
ZP3	hímivarsejtre specifikus zona pellucida-kötő receptor 3 (Zona pellucida sperm-binding protein 3)

9. Irodalomjegyzék

9.1. Hivatkozott közlemények

1. Flemming, R. The invention of infertility in the classical greek world: Medicine, divinity, and gender. *Bulletin of the history of medicine* **2013**, 87, 565-590.
2. Johnston, D.R. The history of human infertility. *Fertility and sterility* **1963**, 14, 261-272.
3. Evans, J. 'They are called imperfect men': Male infertility and sexual health in early modern england. *Social history of medicine : the journal of the Society for the Social History of Medicine* **2016**, 29, 311-332.
4. Longo, L.D. The rise of fetal and neonatal physiology: Basic science to clinical care. Springer Nature Switzerland AG.: 2018; p 842 (p. 117).
5. Andrade-Rocha, F.T. On the origins of the semen analysis: A close relationship with the history of the reproductive medicine. *J Hum Reprod Sci* **2017**, 10, 242-255.
6. Macleod, J.; Gold, R.Z. The male factor in fertility and infertility. Ii. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *The Journal of urology* **2017**, 197, S78-s91.
7. Ombelet, W.; Van Robays, J. Artificial insemination history: Hurdles and milestones. *Facts, views & vision in ObGyn* **2015**, 7, 137-143.
8. Steptoe, P.C.; Edwards, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England)* **1978**, 2, 366.
9. Lanzendorf, S.E.; Maloney, M.K.; Veeck, L.L.; Slusser, J.; Hodgen, G.D.; Rosenwaks, Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertility and sterility* **1988**, 49, 835-842.
10. Nagy György, V.B., Lantos Tibor, Molnár Judit, Oláh Imre, Gerendai Ida, Csáki Ágnes. *Szövettan*. Semmelweis Kiadó: 2014; p 542.
11. Szmelskyj, I.; Aquilina, L.; Szmelskyj, A.O. Chapter 2 - anatomy and physiology of the reproductive system: Prerequisites for conception. In *Acupuncture for ivf and assisted reproduction*, Szmelskyj, I.; Aquilina, L.; Szmelskyj, A.O., Eds. Churchill Livingstone: 2015; pp 23-58.
12. János, S., Miklós, Réthelyi. *Funkcionális anatómia i*. Medicina Könyvkiadó Zrt.: 2006.
13. György, P. *Az andrológia tankönyve*. MEDICINA KÖNYVKIADÓ zRT.: 2000; p 248.
14. Ickowicz, D.; Finkelstein, M.; Breitbart, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: Role of protein kinases. *Asian journal of andrology* **2012**, 14, 816-821.
15. Okabe, M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development (Cambridge, England)* **2013**, 140, 4471-4479.
16. WHO. Obesity and overweight. 2020.
17. Bakos, H.W.; Mitchell, M.; Setchell, B.P.; Lane, M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *International journal of andrology* **2011**, 34, 402-410.
18. Cabler, S.; Agarwal, A.; Flint, M.; du Plessis, S.S. Obesity: Modern man's fertility nemesis. *Asian journal of andrology* **2010**, 12, 480-489.
19. Fejes, I.; Koloszar, S.; Szollosi, J.; Zavaczki, Z.; Pal, A. Is semen quality affected by male body fat distribution? *Andrologia* **2005**, 37, 155-159.

20. Hajshafiha, M.; Ghareaghaji, R.; Salemi, S.; Sadegh-Asadi, N.; Sadeghi-Bazargani, H. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples. *International journal of general medicine* **2013**, *6*, 447-451.
21. Hakonsen, L.B.; Thulstrup, A.M.; Aggerholm, A.S.; Olsen, J.; Bonde, J.P.; Andersen, C.Y.; Bungum, M.; Ernst, E.H.; Hansen, M.L.; Ernst, E.H., *et al.* Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reproductive health* **2011**, *8*, 24.
22. Koloszar, S.; Fejes, I.; Zavaczki, Z.; Daru, J.; Szollosi, J.; Pal, A. Effect of body weight on sperm concentration in normozoospermic males. *Archives of andrology* **2005**, *51*, 299-304.
23. Kort, H.I.; Massey, J.B.; Elsner, C.W.; Mitchell-Leef, D.; Shapiro, D.B.; Witt, M.A.; Roudebush, W.E. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of andrology* **2006**, *27*, 450-452.
24. Campagne, D.M. Can male fertility be improved prior to assisted reproduction through the control of uncommonly considered factors? *International journal of fertility & sterility* **2013**, *6*, 214-223.
25. Holden, C.A.; McLachlan, R.I.; Pitts, M.; Cumming, R.; Wittert, G.; Ehsani, J.P.; de Kretser, D.M.; Handelsman, D.J. Determinants of male reproductive health disorders: The men in australia telephone survey (mates). In *BMC Public Health*, 2010; Vol. 10, p 96.
26. Tunc, O.; Bakos, H.W.; Tremellen, K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* **2011**, *43*, 121-128.
27. Fui Mn Fau - Dupuis, P.; Dupuis P Fau - Grossmann, M.; Grossmann, M. Lowered testosterone in male obesity: Mechanisms, morbidity and management.
28. de Boer, H.; Verschoor L Fau - Ruinemans-Koerts, J.; Ruinemans-Koerts J Fau - Jansen, M.; Jansen, M. Letrozole normalizes serum testosterone in severely obese men with hypogonadotropic hypogonadism.
29. Luboshitzky, R.; Aviv, A.; Hefetz, A.; Herer, P.; Shen-Orr, Z.; Lavie, L.; Lavie, P. Decreased pituitary-gonadal secretion in men with obstructive sleep apnea. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, *87*, 3394-3398.
30. Vermeulen, A.; Kaufman, J.M.; Deslypere, J.P.; Thomas, G. Attenuated luteinizing hormone (lh) pulse amplitude but normal lh pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *J Clin Endocrinol Metab* **1993**, *76*, 1140-1146.
31. Pearce, K.L.; Hill, A.; Tremellen, K.P. Obesity related metabolic endotoxemia is associated with oxidative stress and impaired sperm DNA integrity. *Basic and clinical andrology* **2019**, *29*, 6.
32. Sermondade, N.; Dupont, C.; Faure, C.; Boubaya, M.; Cédric-Durnerin, I.; Chavatte-Palmer, P.; Sifer, C.; Lévy, R. Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile males. *Asian journal of andrology* **2013**, *15*, 626-629.
33. Macdonald, A.A.; Stewart, A.W.; Farquhar, C.M. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in new zealand men: A cross-sectional study in fertility clinics. *Human reproduction (Oxford, England)* **2013**, *28*, 3178-3187.
34. Leslie, S.W.; Sajjad, H.; Siref, L.E. Varicocele. In *Statpearls*, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2020.
35. Jensen, C.F.S.; Ostergren, P.; Dupree, J.M.; Ohl, D.A.; Sonksen, J.; Fode, M. Varicocele and male infertility. *Nature reviews. Urology* **2017**, *14*, 523-533.
36. Kantartzi, P.D.; Goulis, C.; Goulis, G.D.; Papadimas, I. Male infertility and varicocele: Myths and reality. *Hippokratia* **2007**, *11*, 99-104.

37. Ding, H.; Tian, J.; Du, W.; Zhang, L.; Wang, H.; Wang, Z. Open non-microsurgical, laparoscopic or open microsurgical varicocelectomy for male infertility: A meta-analysis of randomized controlled trials. *BJU international* **2012**, *110*, 1536-1542.
38. Jungwirth, A.; Giwercman, A.; Tournaye, H.; Diemer, T.; Kopa, Z.; Dohle, G.; Krausz, C. European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *European urology* **2012**, *62*, 324-332.
39. Pryor, J.L.; Howards, S.S. Varicocele. *The Urologic clinics of North America* **1987**, *14*, 499-513.
40. Schlesinger, M.H.; Wilets, I.F.; Nagler, H.M. Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. *The Urologic clinics of North America* **1994**, *21*, 517-529.
41. Ferlin, A.; Arredi, B.; Foresta, C. Genetic causes of male infertility. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* **2006**, *22*, 133-141.
42. Davila Garza, S.A.; Patrizio, P. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of klinefelter's syndrome, kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and 'stump' tail sperm: An updated literature review. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **2013**, *25*, 229-246.
43. Wang, C.; Baker, H.W.; Burger, H.G.; De Kretser, D.M.; Hudson, B. Hormonal studies in klinefelter's syndrome. *Clinical endocrinology* **1975**, *4*, 399-411.
44. Staessen, C.; Tournaye, H.; Van Assche, E.; Michiels, A.; Van Landuyt, L.; Devroey, P.; Liebaers, I.; Van Steirteghem, A. Pgd in 47, xxy klinefelter's syndrome patients. *Human reproduction update* **2003**, *9*, 319-330.
45. Ramphul, K.; Zulfikar, H.; Mejias, S.G. Sertoli-cell-only syndrome. In *Statpearls*, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2020.
46. Liu, T.; Song, Y.X.; Jiang, Y.M. Early detection of y chromosome microdeletions in infertile men is helpful to guide clinical reproductive treatments in southwest of china.
47. Dwyer, A.A.; Raivio, T.; Pitteloud, N. Gonadotrophin replacement for induction of fertility in hypogonadal men. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2015**, *29*, 91-103.
48. Flannigan, R.; Schlegel, P.N. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **2017**, *44*, 26-37.
49. Wosnitzer, M.S.; Goldstein, M. Obstructive azoospermia. *The Urologic clinics of North America* **2014**, *41*, 83-95.
50. Krausz, C.; Giachini, C. Genetic risk factors in male infertility. *Archives of andrology* **2007**, *53*, 125-133.
51. Giwercman, A.; Hansen, L.L.; Skakkebaek, N.E. Initiation of sperm production after bilateral orchiopexy: Clinical and biological implications. *The Journal of urology* **2000**, *163*, 1255-1256.
52. Lee, P.A.; Houk, C.P. Cryptorchidism. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* **2013**, *20*, 210-216.
53. Heidenreich, A.; Moul, J.W. Contralateral testicular biopsy procedure in patients with unilateral testis cancer: Is it indicated? *Seminars in urologic oncology* **2002**, *20*, 234-238.
54. Colpi, G.M. *L'infertilità maschile oggi - male male infertility today* 2002; Vol. 3.
55. Agarwal, A.; Sekhon, L.H. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human fertility (Cambridge, England)* **2010**, *13*, 217-225.
56. Agarwal, A.; Sekhon, L.H. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified? *Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India* **2011**, *27*, 74-85.

57. Hunt, C.D.; Johnson, P.E.; Herbel, J.; Mullen, L.K. Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *Am J Clin Nutr* **1992**, *56*, 148-157.
58. Kessopoulou, E.; Powers, H.J.; Sharma, K.K.; Pearson, M.J.; Russell, J.M.; Cooke, I.D.; Barratt, C.L. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin e to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and sterility* **1995**, *64*, 825-831.
59. Rolf, C.; Cooper, T.G.; Yeung, C.H.; Nieschlag, E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin c and vitamin e: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Human reproduction (Oxford, England)* **1999**, *14*, 1028-1033.
60. Wallock, L.M.; Tamura, T.; Mayr, C.A.; Johnston, K.E.; Ames, B.N.; Jacob, R.A. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. *Fertility and sterility* **2001**, *75*, 252-259.
61. Hemingway, R.G. The influences of dietary intakes and supplementation with selenium and vitamin e on reproduction diseases and reproductive efficiency in cattle and sheep. *Veterinary research communications* **2003**, *27*, 159-174.
62. Balercia, G.; Mosca, F.; Mantero, F.; Boscaro, M.; Mancini, A.; Ricciardo-Lamonica, G.; Littarru, G. Coenzyme q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: An open, uncontrolled pilot study. *Fertility and sterility* **2004**, *81*, 93-98.
63. Dokmeci, D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia medica* **2005**, *47*, 26-30.
64. Hammoud, A.O.; Meikle, A.W.; Peterson, C.M.; Stanford, J.; Gibson, M.; Carrell, D.T. Association of 25-hydroxy-vitamin d levels with semen and hormonal parameters. *Asian journal of andrology* **2012**, *14*, 855-859.
65. Anagnostis, P.; Karras, S.; Goulis, D.G. Vitamin d in human reproduction: A narrative review. *International journal of clinical practice* **2013**, *67*, 225-235.
66. Abad, C.; Amengual, M.J.; Gosálvez, J.; Coward, K.; Hannaoui, N.; Benet, J.; Garcia-Peiro, A.; Prats, J. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia* **2013**, *45*, 211-216.
67. Busetto, G.M.; Koverech, A.; Messano, M.; Antonini, G.; De Berardinis, E.; Gentile, V. Prospective open-label study on the efficacy and tolerability of a combination of nutritional supplements in primary infertile patients with idiopathic astenoteratozoospermia. *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica* **2012**, *84*, 137-140.
68. Wirleitner, B.; Vanderzwalmen, P.; Stecher, A.; Spitzer, D.; Schuff, M.; Schwerda, D.; Bach, M.; Schechinger, B.; Herbert Zech, N. Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of ivf patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* **2012**, *82*, 391-398.
69. Azizollahi, G.; Azizollahi, S.; Babaei, H.; Kianinejad, M.; Baneshi, M.R.; Nematollahi-mahani, S.N. Effects of supplement therapy on sperm parameters, protamine content and acrosomal integrity of varicocelectomized subjects. *Journal of assisted reproduction and genetics* **2013**, *30*, 593-599.
70. Chua, M.E.; Escusa, K.G.; Luna, S.; Tapia, L.C.; Dofitas, B.; Morales, M. Revisiting oestrogen antagonists (clomiphene or tamoxifen) as medical empiric therapy for idiopathic male infertility: A meta-analysis. *Andrology* **2013**, *1*, 749-757.

71. Attia, A.M.; Abou-Setta, A.M.; Al-Inany, H.G. Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews* **2013**, Cd005071.
72. Imamovic Kumalic, S.; Pinter, B. Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *BioMed research international* **2014**, 2014, 426951.
73. Showell, M.G.; Mackenzie-Proctor, R.; Brown, J.; Yazdani, A.; Stankiewicz, M.T.; Hart, R.J. Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews* **2014**, Cd007411.
74. Ross, C.; Morriss, A.; Khairy, M.; Khalaf, Y.; Braude, P.; Coomarasamy, A.; El-Toukhy, T. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive biomedicine online* **2010**, 20, 711-723.
75. Banihani, S.A. Vitamin b(12) and semen quality. Lid - 10.3390/biom7020042 [doi] lid - 42.
76. Cito, G.A.-O.; Cocci, A.A.-O.; Micelli, E.A.-O.; Gabutti, A.A.-O.; Russo, G.A.-O.; Coccia, M.A.-O.X.; Franco, G.A.-O.; Serni, S.A.-O.X.; Carini, M.A.-O.; Natali, A.A.-O. Vitamin d and male fertility: An updated review.
77. Morales, M.E.; Rico G Fau - Bravo, C.; Bravo C Fau - Tapia, R.; Tapia R Fau - Alvarez, C.; Alvarez C Fau - Méndez, J.D.; Méndez, J.D. [progressive motility increase caused by l-arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia].
78. Agarwal, A.; Said, T.M. Carnitines and male infertility. *Reproductive biomedicine online* **2004**, 8, 376-384.
79. Yang, J.; Wu G Fau - Feng, Y.; Feng Y Fau - Lv, Q.; Lv Q Fau - Lin, S.; Lin S Fau - Hu, J.; Hu, J. Effects of taurine on male reproduction in rats of different ages.
80. Kizilay, F.; Altay, B. Sperm function tests in clinical practice. *Turkish journal of urology* **2017**, 43, 393-400.
81. Rogers, B.J.; Van Campen, H.; Ueno, M.; Lambert, H.; Bronson, R.; Hale, R. Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertility and sterility* **1979**, 32, 664-670.
82. Oehninger, S.; Franken, D.R.; Sayed, E.; Barroso, G.; Kolm, P. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in ivf therapy: A meta-analysis. *Human reproduction update* **2000**, 6, 160-168.
83. Oehninger, S.; Morshedi, M.; Franken, D. The hemizona assay for assessment of sperm function. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2013**, 927, 91-102.
84. Goericke-Pesch, S.; Failing, K. Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (hos) test and acrosomal evaluation using spermac((r)). *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **2013**, 48, 213-217.
85. Fernandez, J.L.; Muriel, L.; Goyanes, V.; Segrelles, E.; Gosalvez, J.; Enciso, M.; LaFromboise, M.; De Jonge, C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility* **2005**, 84, 833-842.
86. Noblanc, A.; Kocer, A.; Drevet, J.R. Recent knowledge concerning mammalian sperm chromatin organization and its potential weaknesses when facing oxidative challenge. *Basic and clinical andrology* **2014**, 24, 6.
87. Tomlinson, M.J.; Moffatt, O.; Manicardi, G.C.; Bizzaro, D.; Afnan, M.; Sakkas, D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: Implications for assisted conception. *Human reproduction (Oxford, England)* **2001**, 16, 2160-2165.

88. Palermo, G.D.; Neri, Q.V.; Cozzubbo, T.; Rosenwaks, Z. Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertility and sterility* **2014**, *102*, 1508-1517.
89. Gopalkrishnan, K.; Hinduja, I.N.; Kumar, T.C. In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: Assessing fertilizing potential. *Archives of andrology* **1991**, *27*, 43-50.
90. Natali, A.; Turek, P.J. An assessment of new sperm tests for male infertility. *Urology* **2011**, *77*, 1027-1034.
91. Huszar, G.; Ozenci, C.C.; Cayli, S.; Zavaczki, Z.; Hansch, E.; Vigue, L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and sterility* **2003**, *79 Suppl 3*, 1616-1624.
92. Abstracts of the 27th annual meeting of the american society of andrology. April 24-27, 2002. Seattle, washington, USA. *Journal of andrology* **2002**, *Suppl*, 23-61.
93. Myles, D.G.; Primakoff, P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins ph-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of reproduction* **1997**, *56*, 320-327.
94. Sabeur, K.; Cherr, G.N.; Yudin, A.I.; Overstreet, J.W. Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the ph-20 protein. *Zygote (Cambridge, England)* **1998**, *6*, 103-111.
95. Gupta, S.K.; Bhandari, B.; Shrestha, A.; Biswal, B.K.; Palaniappan, C.; Malhotra, S.S.; Gupta, N. Mammalian zona pellucida glycoproteins: Structure and function during fertilization. *Cell and tissue research* **2012**, *349*, 665-678.
96. Redgrove, K.A.; Nixon, B.; Baker, M.A.; Hetherington, L.; Baker, G.; Liu, D.Y.; Aitken, R.J. The molecular chaperone hspa2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* **2012**, *7*, e50851.
97. Abdelmassih, S.; Cardoso, J.; Abdelmassih, V.; Dias, J.A.; Abdelmassih, R.; Nagy, Z.P. Laser-assisted icsi: A novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Human reproduction (Oxford, England)* **2002**, *17*, 2694-2699.
98. Ergur, A.R.; Dokras, A.; Giraldo, J.L.; Habana, A.; Kovanci, E.; Huszar, G. Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (ivf) or intracytoplasmic sperm injection: Diminished sperm hspa2 chaperone levels predict ivf failure. *Fertility and sterility* **2002**, *77*, 910-918.
99. Huszar, G.; Ozkavukcu, S.; Jakab, A.; Celik-Ozenci, C.; Sati, G.L.; Cayli, S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: Selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **2006**, *18*, 260-267.
100. Celik-Ozenci, C.; Jakab, A.; Kovacs, T.; Catalanotti, J.; Demir, R.; Bray-Ward, P.; Ward, D.; Huszar, G. Sperm selection for icsi: Shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Human reproduction (Oxford, England)* **2004**, *19*, 2052-2059.
101. Jakab, A.; Sakkas, D.; Delpiano, E.; Cayli, S.; Kovanci, E.; Ward, D.; Revelli, A.; Huszar, G. Intracytoplasmic sperm injection: A novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertility and sterility* **2005**, *84*, 1665-1673.
102. Huszar, G.; Jakab, A.; Sakkas, D.; Ozenci, C.C.; Cayli, S.; Delpiano, E.; Ozkavukcu, S. Fertility testing and icsi sperm selection by hyaluronic acid binding: Clinical and genetic aspects. *Reproductive biomedicine online* **2007**, *14*, 650-663.

103. Nasr-Esfahani, M.H.; Razavi, S.; Vahdati, A.A.; Fathi, F.; Tavalaei, M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on icsi outcome. *Journal of assisted reproduction and genetics* **2008**, *25*, 197-203.
104. Huszar, G. Sperm testing and icsi selection by hyaluronic acid binding: The hyaluronic acid-coated glass slide and petri dish in the andrology and ivf laboratories. 2012; pp 241-257.
105. Worrlow, K.C.; Eid, S.; Woodhouse, D.; Perloe, M.; Smith, S.; Witmyer, J.; Ivani, K.; Khoury, C.; Ball, G.D.; Elliot, T., *et al.* Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (icsi): Significant improvement in clinical outcomes--multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Human reproduction (Oxford, England)* **2013**, *28*, 306-314.
106. Mongkolkehaipak, S.; Vutyavanich, T. No difference in high-magnification morphology and hyaluronic acid binding in the selection of euploid spermatozoa with intact DNA. *Asian journal of andrology* **2013**, *15*, 421-424.
107. Avalos-Durán, G.; Cañedo-Del Ángel, A.M.E.; Rivero-Murillo, J.; Zambrano-Guerrero, J.E.; Carballo-Mondragón, E.; Checa-Vizcaíno, M. Physiological icsi (picsi) vs. Conventional icsi in couples with male factor: A systematic review.
108. Yagci, A.; Murk, W.; Stronk, J.; Huszar, G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: An acridine orange fluorescence study. *Journal of andrology* **2010**, *31*, 566-572.
109. Cole, L.A. Chapter 19 - sperm activation, fertilization, morula, blastocyst formation, and twinning. In *Biology of life*, Cole, L.A., Ed. Academic Press: 2016; pp 143-150.
110. Petrosian, A.M.; Haroutounian, J.E. Taurine as a universal carrier of lipid soluble vitamins: A hypothesis. *Amino acids* **2000**, *19*, 409-421.
111. Schaffer, S.; Takahashi, K.; Azuma, J. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino acids* **2000**, *19*, 527-546.
112. Wong, W.Y.; Merkus, H.M.; Thomas, C.M.; Menkveld, R.; Zielhuis, G.A.; Steegers-Theunissen, R.P. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and sterility* **2002**, *77*, 491-498.
113. Ng, C.M.; Blackman, M.R.; Wang, C.; Swerdloff, R.S. The role of carnitine in the male reproductive system. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2004**, *1033*, 177-188.
114. Sheweita, S.A.; Tilmisany, A.M.; Al-Sawaf, H. Mechanisms of male infertility: Role of antioxidants. *Current drug metabolism* **2005**, *6*, 495-501.
115. Cooper, T.G.; Noonan, E.; von Eckardstein, S.; Auger, J.; Baker, H.W.; Behre, H.M.; Haugen, T.B.; Kruger, T.; Wang, C.; Mbizvo, M.T., *et al.* World health organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update* **2010**, *16*, 231-245.
116. Szucs, M.; Osvath, P.; Laczko, I.; Jakab, A. Adequacy of hyaluronan binding assay and a new fertility index derived from it for measuring of male fertility potential and the efficacy of supplement therapy. *Andrologia* **2015**, *47*, 519-524.
117. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults--the evidence report. National institutes of health. *Obesity research* **1998**, *6 Suppl 2*, 51s-209s.
118. Ombelet, W.; Bosmans, E.; Janssen, M.; Cox, A.; Vlasselaer, J.; Gyselaers, W.; Vandeput, H.; Gielen, J.; Pollet, H.; Maes, M., *et al.* Semen parameters in a fertile versus subfertile population: A need for change in the interpretation of semen testing. *Human reproduction (Oxford, England)* **1997**, *12*, 987-993.

119. Huszar, G.; Vigue, L.; Oehninger, S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: Selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertility and sterility* **1994**, *61*, 136-142.
120. Ranganathan, S.; Ganguly, A.K.; Datta, K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Molecular reproduction and development* **1994**, *38*, 69-76.
121. Nguyen, R.H.; Wilcox, A.J.; Skjaerven, R.; Baird, D.D. Men's body mass index and infertility. *Human reproduction (Oxford, England)* **2007**, *22*, 2488-2493.
122. Sermondade, N.; Faure, C.; Fezeu, L.; Shayeb, A.G.; Bonde, J.P.; Jensen, T.K.; Van Wely, M.; Cao, J.; Martini, A.C.; Eskandar, M., *et al.* Bmi in relation to sperm count: An updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human reproduction update* **2013**, *19*, 221-231.
123. Chavarro, J.E.; Toth, T.L.; Wright, D.L.; Meeker, J.D.; Hauser, R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertility and sterility* **2010**, *93*, 2222-2231.
124. Ramaraju, G.A.; Teppala, S.; Prathigudupu, K.; Kalagara, M.; Thota, S.; Kota, M.; Cheemakurthi, R. Association between obesity and sperm quality. *Andrologia* **2018**, *50*.
125. Keskin, M.Z.; Budak, S.; Aksoy, E.E.; Yücel, C.; Karamazak, S.; Ilbey, Y.O.; Kozacıoğlu, Z. Investigation of the effect of body mass index (bmi) on semen parameters and male reproductive system hormones. *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica* **2017**, *89*, 219-221.
126. Keltz, J.; Zapantis, A.; Jindal, S.K.; Lieman, H.J.; Santoro, N.; Polotsky, A.J. Overweight men: Clinical pregnancy after art is decreased in ivf but not in icsi cycles. *Journal of assisted reproduction and genetics* **2010**, *27*, 539-544.
127. Thomsen, L.; Humaidan, P.; Bungum, L.; Bungum, M. The impact of male overweight on semen quality and outcome of assisted reproduction. *Asian journal of andrology* **2014**, *16*, 749-754.
128. Wegner, C.C.; Clifford, A.L.; Jilbert, P.M.; Henry, M.A.; Gentry, W.L. Abnormally high body mass index and tobacco use are associated with poor sperm quality as revealed by reduced sperm binding to hyaluronan-coated slides. *Fertility and sterility* **2010**, *93*, 332-334.
129. Palmer, N.O.; Bakos, H.W.; Fullston, T.; Lane, M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis* **2012**, *2*, 253-263.
130. Aggerholm, A.S.; Thulstrup, A.M.; Toft, G.; Ramlau-Hansen, C.H.; Bonde, J.P. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertility and sterility* **2008**, *90*, 619-626.
131. Kerr, J.B.; Millar, M.; Maddocks, S.; Sharpe, R.M. Stage-dependent changes in spermatogenesis and sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *The Anatomical record* **1993**, *235*, 547-559.
132. Kley, H.K.; Deselaers, T.; Peerenboom, H.; Krüskemper, H.L. Enhanced conversion of androstenedione to estrogens in obese males. *J Clin Endocrinol Metab* **1980**, *51*, 1128-1132.
133. Caprio, M.; Isidori, A.M.; Carta, A.R.; Moretti, C.; Dufau, M.L.; Fabbri, A. Expression of functional leptin receptors in rodent leydig cells. *Endocrinology* **1999**, *140*, 4939-4947.

134. Shiraishi, K.; Takihara, H.; Matsuyama, H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World journal of urology* **2010**, *28*, 359-364.

9.2. Saját közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK224//2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szűcs Miklós

Neptun kód: GWW6YT

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szűcs, M.**, Osváth, P., Jakab, A., Varga, D., Varga, B., Juhász, B.: Hyaluronan bound mature sperm count (HB-MaSC) is a more informative indicator of fertility than conventional sperm parameters: correlations with Body Mass Index (BMI).
Reproductive Biology. 19 (1), 38-44, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2019.02.002>
IF: 1.862
2. **Szűcs, M.**, Osváth, P., Laczkó, I., Jakab, A.: Adequacy of hyaluronan binding assay and a new fertility index derived from it for measuring of male fertility potential and the efficacy of supplement therapy.
Andrologia. 47 (5), 519-524, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/and.12296>
IF: 1.441

További közlemények

3. Riesz, P., Rusz, A., **Szűcs, M.**, Majoros, A., Nyirády, P., Keszthelyi, A., Szűcs, M., Mavrogenis, S., Filkor, G., Pánovics, J., Romics, I.: A merevedési zavar megelőzése és kezelésének lehetőségei radikális prostatectomia után.
Orv. hetil. 150 (18), 831-837, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28569>
4. Berczi, C., Lőrincz, L., **Szűcs, M.**, Tállai, B., Flaskó, T., Tóth, C.: Percutaneous Endoscopic Ureterolithotomy of Two Different Stones in a Single Session.
J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. 18 (2), 280-281, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/lap.2007.0054>
IF: 0.912





5. Berczi, C., Tóth, G., Tállai, B., Salah, M. A., **Szűcs, M.**, Flaskó, T.: Metachron vesedaganatok kezelésével szerzett tapasztalataink.
Magyar Urol. 19 (2), 97-101, 2007.
6. Tállai, B., Nagy, J., Fornet, B., Tóth, G., **Szűcs, M.**, Flaskó, T., Gyarmati, J., Tóth, C.:
Tapasztalataink endorectalis mágneses rezonancia vizsgálattal a prosztatákarcinóma helyi kiterjedésének megítélésében.
Magyar Urol. 18, 211-218, 2006.
7. **Szűcs, M.**, Berczi, C., Flaskó, T., Kassai, Z., Tóth, C.: A férfi meddőség esetén alkalmazott tesztoszteron terápia szükségességének megítélése a szérum és ejakulátum tesztoszteronszint vizsgálatának tükrében.
Magyar Urol. 17, 122-126, 2005.
8. Berczi, C., Varga, A., Flaskó, T., Salah, M. A., **Szűcs, M.**, Tállai, B., Tóth, C.: A radikális perinealis prostatectomiák eredményessége műtét előtti 20 ng/ml feletti PSA-szint esetén.
Uroonkológia. 2 (3), 67-70, 2005.
9. Farkas, A., Csanádi, G., Tóth, G., **Szűcs, M.**, Berczi, C., Varga, A., Tóth, C.: Egészséges fiatal férfi Fournier-gangrénája.
Magyar Urol. 17 (4), 222-228, 2005.
10. Flaskó, T., Tállai, B., **Szűcs, M.**, Berczi, C., Salah, M. A., Tóth, C.: Laparoscopos vesetumor-reszekció: tapasztalataink 20 eset kapcsán.
Endosc. Minim. Invazív Ter. 7 (2), 23-26, 2005.
11. Berczi, C., **Szűcs, M.**, Orosz, L., Farkas, A., Tállai, B., Tóth, C.: Pyelon- és uréterdaganatok kezelése.
Magyar Urol. 17, 93-97, 2005.
12. Tállai, B., Varga, A., Flaskó, T., **Szűcs, M.**, Orosz, L., Tóth, C.: Tapasztalataink mini perkután nephrolithotomiával.
Magyar Urol. 17, 87-92, 2005.
13. Tóth, C., **Szűcs, M.**: Veseparechyma-daganatok.
In: Urológia. Szerk.: Tóth Csaba, Medicina, Budapest, 121-126, 2005.
14. **Szűcs, M.**, Sümegi, A., Tóth, C.: "Idiopátiás" azoospermia háttérében észlelt Y-kromoszóma mikrodeléció kimutatása.
Magyar Urol. 15, 182-184, 2003.
15. Flaskó, T., Varga, A., Tállai, B., Salah, M. A., **Szűcs, M.**, Tóth, G., Tóth, C.: Laparoszko-
pós műtéteinkkel szerzett kezdeti tapasztalataink.
Magyar Urol. 15, 195-202, 2003.
16. Tállai, B., Varga, A., Flaskó, T., **Szűcs, M.**, Berczi, C., Salah, M. A., Tóth, C.: Vesetuberkulózis nehezen felderített esete.
Endosc. Minim. Invazív Ter. 6, 5-10, 2003.





17. Berczi, C., Varga, A., Flaskó, T., **Szűcs, M.**, Tóth, C.: Laparoscopos adrenalectomia ritka urológiai szövődménye.
Magyar Urol. 14 (4), 343-348, 2002.
18. **Szűcs, M.**, Csiszár, P., Csanádi, G., Bazsáné Kassai, Z.: A percutan kétoldali "mapping" herebiopsiák jelentősége az ICSI-re való alkalmasság megítélésében.
Magy. androl. 6, 22-25, 2001.
19. **Szűcs, M.**, Salah, M. A., Tándor, Z., Kovács, J., Csanádi, G.: Percutan mapping biopsia alkalmazása korábban heretumor miatt kezelt azoospermias esetekben.
Endosc. Minim. Invazív Ter. 4 (4), 65-66, 2001.
20. Körösi, T., Barta, C., Rajczy, K., **Szűcs, M.**, Bazsáné Kassai, Z., Kaáli, S. G.: Transport TESE-ICSI: ikerterhesség és szülés hereszövet transzportját követő intracitoplazmatikus spermium injiciálás után.
Magyar Androl. 6, 32-34, 2001.
21. Fehér, J. M., Korányi, L., Nagy, A., **Szűcs, M.**: A retroperitonealis lymphadenectomia szükségessége a klinikai I. stádiumú nem seminomás heretumoros betegeknél.
Magyar Urol. 8, 33-37, 1996.
22. Fehér, J. M., Korányi, L., Flaskó, T., **Szűcs, M.**: Roferon A és Vinblastin terápiával szerzett tapasztalataink vesetumoros betegeknél.
Magyar Urol. 7, 5-9, 1995.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 4,215

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
3,303**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.07.07.



10. Tárgyszavak

spermiumminőség, BMI, hyaluronsav kötési assay (HBA[®]), hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma (HB-MaSC)

sperm quality, BMI, Hyaluronan Binding Assay (HBA[®]), Hyaluronan Bound Matured Sperm Count (HB-MaSC)

hyaluronsav kötési assay, intracitoplazmatikus spermiuminjekció, férfi infertilitás, intracytoplasmatikus spermium injekcióra kiválasztott, kiegészítő terápia

Hyaluronan Binding Assay, intracytoplasmic sperm injection, male infertility, picked for intracytoplasmic sperm injection, supplement therapy

11. Köszönetnyilvánítás

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Táplálkozás-és Élelmiszertudományi Doktori Iskola egyéni felkészülési hallgatójaként készítettem. Köszönet Prof. Dr. Szilvássy Zoltán, egyetemi tanár, Rektor Úrnak, hogy lehetővé tette a doktori iskolában való részvételt, valamint köszönet témavezetőimnek, Dr. Juhász Béla és Dr. Jakab Attila docens uraknak a munkámban való pótolhatatlan segítségnyújtásért. Külön köszönet illeti meg a DE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársainak a szakmai és emberi segítségét, valamint a KEK Urológiai és Andrológiai Osztály dolgozóinak odaadó szakmai és baráti támogatását.

Hálával tartozom Dr. Osváth Péternek, Dr. Kiss Ritának, Dr. Varga Balázsnak és Dr. Gesztelyi Rudolfnak a számos alkalommal rám szánt idejük és energiájuk miatt.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Kardos Lászlónak és Karányi Zsoltnak a statisztikai elemzésért, Dr. Laczkó Istvánnak és Dr. Varga Dánielnek a cikkünk írásában való közreműködéséért, Hollós Nórának a korrektúrázás és a kézirat angol nyelvi kérdéseinek áttekintésében végzett nehéz munkájáért és Buglyó Árminnak a fordításokban való segítségéért, valamint Csikos Csabának az ábrák elkészítésében nyújtott segítségéért.

Szeretném továbbá kifejezni legmélyebb megbecsülésemet Prof. Dr. Tóth Csabának, Prof. Dr. Papp Györgynek és néhai Prof. Dr. Huszár Gábornak, amiért motiváltak és inspiráltak, és barátomnak, Dr. Szöőr Balázsnak az útmutatásaiért és a javaslataiért, valamint Dr. Bodnár Tibornak, az Arnika kft. ügyvezetőjének a gyakorlati segítségéért, és Anton Pálnak a hasznos tanácsaiért.

Jelen tanulmány a GINOP-2.3.4-15-2016-00002: „A felsőoktatás és az ipar együttműködése az egészségiparban” című pályázat keretén belül valósulhatott meg. További támogatást a 20428-3/2018/FEKUTSTRAT, valamint a Tématerületi kiválósági program 2019, ED_18-1-2019-0028 iktatószámú támogatási szerződés nyújtottak. A tanulmány alapjául szolgáló kutatás megvalósulását ezen felül az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Terápiás célú fejlesztések tématerületi programja keretében.

12. Függelék

ORIGINAL ARTICLE

Adequacy of hyaluronan binding assay and a new fertility index derived from it for measuring of male fertility potential and the efficacy of supplement therapy

M. Szucs¹, P. Osvath¹, I. Laczko¹ & A. Jakab²¹ Department of Urology and Andrology, Kenézy Gyula Hospital, Debrecen, Hungary;² Department of Obstetrics and Gynecology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary**Keywords**

Hyaluronan binding assay—intracytoplasmic sperm injection—male infertility—picked for intracytoplasmic sperm injection—supplement therapy

Correspondence

Miklos Szucs, Department of Urology and Andrology, Kenézy Gyula Hospital, Bartok Bela str 2-26, H-4031 Debrecen, Hungary.
Tel./Fax: +36 52 511767;
E-mail: drszucs@gmail.com

Accepted: March 29, 2014

doi: 10.1111/and.12296

Summary

The aim of the study was to statistically prove that the HBA[®] test is an efficient practical method for andrologists to determine the fertility potential as well as to measure the efficiency of oral supplement therapy in case of male infertility. In the study, 175 patients were involved and it also included the follow-up studies of 39 patients after supplement therapy. Completing the 'classic' spermatological parameters with the results of HBA[®] test, the authors have also determined a new fertility index to be used for practical rating of the measure of fertility potential. After the supplement therapy, both sperm density and hyaluronan binding capacity increased significantly. The authors are convinced that the HBA[®] analysis is an objective, standardisable test, which provides a better approach to fertility potential. This analysis enables us to detect spermatozoa that were previously misjudged as normal by morphological assay and also makes the efficiency of the therapy more measurable.

Introduction

Oxidative stress contributes to impairment of spermatogenesis leading to male infertility. Increasing reactive molecules (oxygen radicals, OH) in reproductive organs of males can damage the cell membrane of spermatozoa leading to a considerably decreased fertility potential. Therefore, antioxidant therapy can be useful in the treatment of infertility caused by oxidative stress. (Agarwal & Sekhon, 2010, 2011;). Mostly the influence of vitamin E and C, L-carnitine, zinc, coenzyme Q10 and folic acid and, recently, vitamin D3 have been examined (Hunt *et al.*, 1992; Kessopoulou *et al.*, 1995; Rolf *et al.*, 1999; Wallock *et al.*, 2001; Hemingway, 2003; Balercia *et al.*, 2004; Dokmeci, 2005; Hammoud *et al.*, 2012; Anagnostis *et al.*, 2013;), and it can generally be stated that antioxidant therapy can either improve sperm density and motility and also reduce the amount of DNA fragmentation in the spermatozoa (Abad *et al.*, 2013).

The benefits of complex supplement therapy were previously well studied and published. Busetto *et al.* (2012) treated 114 infertile asthenozoospermic individuals with a complex supplement therapy. At the end of the study, after at least 4 months of supplement therapy, there was no significant increase in sperm density;

however, progressive sperm motility increased significantly, and 16 partners of the patients achieved pregnancy. Semen quality before and after antioxidant therapy was also measured in men participating in an IVF programme. The results showed that antioxidative and micronutrient supplementation had a remarkable benefit for IVF patients, especially those with oligo-astheno-teratozoospermia (OAT) (Wirleitner *et al.*, 2012). In another study, patients with varicocele were observed after surgery and supplement therapy. Azizollahi *et al.* (2013) found that supplementation with folate and zinc after varicocele surgery resulted in improved sperm quality, so it can be an effective complementary therapy besides surgery.

The previously used routine spermatological examinations are nowadays not sufficient (Ombelet *et al.*, 1997). Several new tests were introduced to enable functional examinations of sperm, such as the hyaluronan binding assay (HBA[®]), which proved to be much more efficient before the assisted reproductive technologies (Natali & Turek, 2011).

The theoretical base of HBA is that hyaluronic acid is present in almost every type of tissues of the human body as well as in the female genital tract, such as in cervical mucus or in cumulus oophorus with which sperm con-

tacts (Huszar *et al.*, 2002, 2003). Only mature sperm expressing hyaluronic binding receptors (HBR) are able to connect to cumulus cells which consist of polysaccharide matrix containing hyaluronic acid (Myles & Primakoff, 1997). During the maturation process of spermatozoa, in addition to HBRs other specific receptors such as PH20 protein with hyaluronidase enzyme activity are present even on the matured sperm membrane and in the lysosome-derived acrosome. This enzyme (PH20) of the matured sperm is capable to dissolve the matrix that keeps together the cells of cumulus oophorus containing hyaluronic acid (Sabeur *et al.*, 1998). Connection between sperm and oocyte is established by the male gamete specific ZP3-binding receptor and the so-called ZP3 anchoring protein located on the surface of the oocyte (Gupta *et al.*, 2012). It is important to note that the above mentioned receptors expressed by the sperm cell are a part of the maturing process inside the male genital tract; therefore, the female genital tract is not needed during the examination process. Recently, it has been proved that the chaperone protein HspA2 can be responsible for the connection between the immaturity of sperm (which contributes among others to the absence of hyaluronan-binding receptor, ZP3-binding receptor and PH20 enzyme) and the aneuploidy (Redgrove *et al.*, 2012). Several studies revealed that HspA2 level of the immature spermatozoa is low; thereby they are unable to connect to the pellucid zone, which leads to increased rate of different defects during the meiosis (Abdelmassih *et al.*, 2002; Ergur *et al.*, 2002; Huszar *et al.*, 2006). *In vitro* only mature spermatozoa are able to connect to the hyaluronic acid-treated surface - similarly to *in vivo* to the zona pellucida - which indicates a new possibility to differentiate between mature and immature cells.

Huszar and his colleagues developed and successfully applied a sperm-selection method based on this binding capacity of hyaluronan of the mature sperm (Huszar *et al.*, 2002; Celik-Ozenci *et al.*, 2004; Jakab *et al.*, 2005). Sperm selection carried out with hyaluronan binding is a safe and promising sperm selection method to improve the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), leading to the introduction of 'picked for intracytoplasmic sperm injection (PICSI®', Biocoat, Inc., Horsham, PA, USA)' method in clinical practice (Huszar *et al.*, 2007; Nasr-Esfahani *et al.*, 2008; Huszar, 2012; Worilow *et al.*, 2012; Mongkolchaipak & Vutyavanich, 2013). This selection also efficiently decreases the risk of transmission of numerical chromosomal abnormalities in offsprings (Jakab *et al.*, 2005). Yagci *et al.* (2010) demonstrated that hyaluronic acid shows a high degree of selectivity for sperm with high DNA integrity, and so the HBA® analysis also provides information even on the DNA integrity, leading to eliminate genetic examination in many cases.

In summary, the binding of the sperm to hyaluronic acid (HA) correlates with the following: maturity of cell, lower degree of chromosomal aneuploidy, decrease of DNA fragmentation, increased chromatin integrity, normal head-morphology and consequently improved fertility potential (Huszar *et al.*, 2003). According to the percentage of sperm binding to hyaluronic acid, previous studies have determined the different fertility potential levels of men. Large, well designed studies found that the pregnancy loss rate was significantly higher if the pre-procedure HA binding was below 65% (Worilow *et al.*, 2012), so the lower reference limit of hyaluronan binding is considered to be 65%.

However, as sperm density is necessary for the treatment strategies and motility influences the HA binding capacity, we assume that in the everyday andrological practice, simply, the HBA score itself without knowing the sperm density and rate of progressively moving spermatozoa does not provide sufficient information for evaluation of male fertility.

The aims of our study were (i) to examine the applicability of a new fertility index derived from the HBA score to determine the fertility potential and (ii) to measure the efficacy of oral supplement therapy in male infertility with the use of the HBA scoring and a new index.

Patients and methods

We assessed the data of 175 patients over 18 years having an infertile relationship for more than 12 months. Routine andrological examination had not revealed any medically or surgically treatable disorder. For every patient, we performed physical and testicular ultrasound examination, microscopic semen analysis (according to the WHO manual for semen analysis, fifth edition, 2010) and HBA test. The study also includes the follow-up 39 patients of these 175 men, who were controlled by microscopic semen analysis and HBA test after supplement therapy (treated group); the remaining 136 patients had only one examination as they failed to reappear on follow-up examination due to unknown reasons (untreated group); therefore, their data were not included in the comparative statistical analysis.

The average age was $33.41 \pm \text{SD } 3.71$ year of the treated and the later controlled men ($N = 39$), and $34.65 \pm \text{SD } 4.72$ year for patients who took part in the single examination. ($N = 136$).

In this study, complex dietary supplements were taken by patients orally during the therapy, which included the most of nutritive factors in proper dose that are proved to be effective by previous studies and have high antioxidant content (L-carnitine L-tartrate: 148 mg, arginine-hydrochloride: 90.78 mg, Taurine: 125 mg, tocoferol-ace-

tate 75%: 105 mg, vitamin C: 63 mg, magnesium-oxide: 78.20 mg, zinc sulphate monohydrate: 9.61 mg, beta-carotene 20%: 9.45 mg, vitamin D3: 100 000 IU g⁻¹, vitamin B12 0.1%: 1.31 mg, piridoxine- hydrochloride: 0.97 mg, coenzyme Q10: 5.25 mg, folic acid: 0.21 mg, sodium-selenite -mannite (Se 0.2%): 9.19 mg) (FER14[®] distributed by Andromedic Ltd., Debrecen, Hungary) (Petrosian & Haroutounian, 2000; Schaffer *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2002; Agarwal & Said, 2004; Ng *et al.*, 2004; Sheweita *et al.*, 2005; Huszar *et al.*, 2007). Dietary supplement therapy has lasted for at least three to maximum 6 months, depending of the patient compliance and follow-up examination was performed after completion of oral therapy. Adverse side effects have not been occurred during the observation.

The follow-up time varied between 3 and 6 month after the first analysis with a mean of 3.4 months.

The spermatological examinations have been performed after a standard of 4 days abstinence with phase-contrast microscope (magnification 200–400×) and with Makler counting chamber under constant conditions (in room temperature 10 µl of liquefied native semen were used). We performed at least two analyses, and we have considered the mean of the results. Data collection and assessment were performed by the standards of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition (2010).

The functional evaluation of sperm has been performed with the commercially available HBA[®] tests (Biocoat Inc., Horsham, PA, USA). The test was carried out according to the recommendation of the producer. Briefly, 7–10 µl native semen was dropped onto special slide with hyaluronic acid coated surface. After 10–15 min of incubation at room temperature, the binding rate of the sperm cells was determined.

Combining the parameters used so far (sperm density, motility, morphology) with the results of HBA[®] test, we found practically useful to get these data together in one index. We call this index HB-MaSC (Hyaluronan Bound Matured Sperm Count), which stands for the multiplication of sperm density in 1 ml semen, the percentage of progressively motile sperm and the percentile of moving spermatozoa binding to hyaluronic acid. The progressivity (PR) was established according to the criteria of WHO manual (2010) (Cooper *et al.*, 2010) [HB-MaSC = Number of spermatozoa (10⁶ ml⁻¹) × WHO-PR (%) × HBA[®] score (%)] Unit: 10⁶ ml⁻¹ According to World Health Organization (WHO) Reference Values for Fertile Men and the previous studies with HBA, the lower reference limit for HB-MaSC is 5.6 × 10⁶ ml⁻¹ (using the WHO values belongs to the '10 Centiles').

Statistical tests have been carried out using 'STATISTICA for Windows' (StatSoft Hungary Ltd., Budapest, Hun-

gary). *T*-tests, Mann–Whitney test and Chi-square tests were used in the analysis as indicated in the results.

Results

HBA score and HB-MaSC in clinically infertile men

Our examinations revealed that in 59.75% (95 out of 159) of andrological examinations the patients found to have normozoospermia, but the values of HBA% and HB-MaSC index are lower than the published normal values, which underline the importance of using this improved method. Based on the WHO manual for semen analysis (5th edition, 2010), those were considered normozoospermic whose semen volume was above 1.5 ml, the total sperm number was above 39 × 10⁶ ml⁻¹, sperm density was at least 15 × 10⁶ ml⁻¹, total motility more than 40% and the progressive motility more than 32%. HB-MaSC is a sensitive indicator of changes in sperm quality reflecting also the proportion of motile sperm based on the following results.

Changes of sperm parameters, HBA score and HB-MaSC after supplement treatment

The average sperm density was 36.55 ± 1.82 (mean ± SEM) in the untreated group (*N* = 136). In the treated group (*N* = 39), at the first analysis, the average sperm density (10⁶ ml⁻¹) was 24.95 ± 2.91 (mean ± SEM) before supplement administration, and after the therapy it increased to 35.68 ± 4.32 (mean ± SEM). The difference has been shown to be significant (*P* = 0.00805) (*T*-test, Table 1, Fig. 1).

In the treated group, at the first analysis, the average HBA rate (%) was 38.71 ± 3.12 (mean ± SEM) and after the supplement therapy it increased to 49.95 ± 2.99 (mean ± SEM). A statistically significant increase was detected in HBA rate (*P* = 0.000004) (Table 1, Fig. 2).

Calculated HB-MaSC value (10⁶ ml⁻¹) was 5.38 ± 0.86 (mean ± SEM) at the first time of the examination, and it was 11.47 ± 1.93 10⁶ ml⁻¹ after the treatment. A statisti-

Table 1 Results in the supplementary therapy treated group (*N* = 39, results showed as mean ± standard error of mean)

	Sperm density [10 ⁶ ml ⁻¹]	HBA rate [%]	Calculated HB-MaSC [10 ⁶ ml ⁻¹]
Before treatment	24.95 ± 2.91	38.71 ± 3.12	5.38 ± 0.86
After treatment	35.68 ± 4.32	49.95 ± 2.99	11.47 ± 1.93

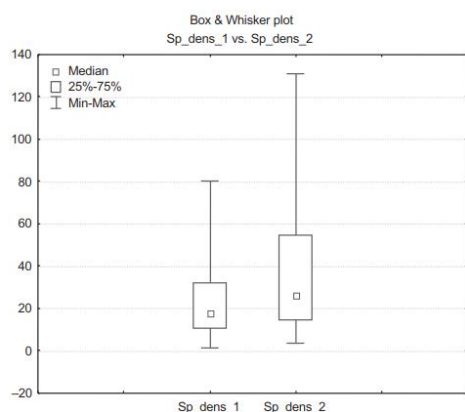


Fig. 1 Sperm density before (Sp_dens_1) and after (Sp_dens_2) supplement therapy (10^6 ml^{-1}).

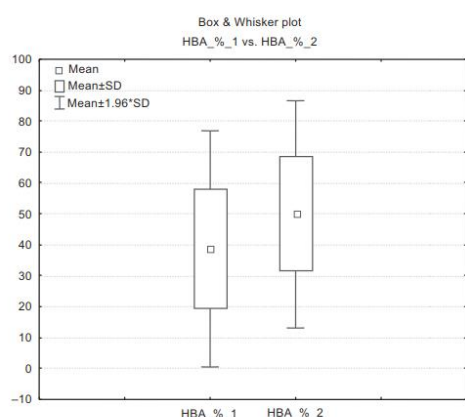


Fig. 2 Changing of the HA binding (HBA %) after supplement therapy (HBA_%_1: before; HBA_%_2: after therapy).

cally significant increase was observed ($P = 0.000015$, Table 1).

Treated patients were also followed up via phone 1.5–2 years after the therapy. The partners of 11 treated patients (28.21%) had given birth to healthy babies without assisted reproduction methods. Another seven partners (17.95%) delivered with the help of assisted reproductive techniques (intrauterine insemination or intracytoplasmic sperm injection). Consequently, as a result of supplement treatment, 46.15% of the couples

who had previously been classified as infertile achieved to have babies.

Discussion

The complex dietary supplements containing taurine, magnesium, carnitine, arginine, vitamin C, vitamin E, coenzyme Q10, zinc, beta-carotene, vitamin B6, folic acid, selenium, vitamin B12 and vitamin D3 could be beneficial in the treatment of male infertility. According to the majority of relevant literature, we have experienced that the number of sperm and ability to successfully fertilise showed significant improvement due to complex supplement therapy.

Previously, it has been proved that the simple spermatozoological examinations based on morphology are not sufficient for the new requirements of assisted reproductive techniques. Based on our results, we are convinced that the HBA analysis and the index originated from it (HB-MaSC) is an objective, standardisable test, which provides a better approach to fertility potential, as it also reflects the proportion of motile sperm. We believe that this improved parameter provides the real number of functioning, matured spermatozoa in one ml semen sample. HBA analysis can be an important diagnostic tool also in cases of infertility with normozoospermia. This analysis enables us to detect abnormal samples that were previously misjudged as normal by morphological assay and also makes the efficacy of the therapy much more measurable. This assay provides help for the professionals working in the field of infertility to choose between insemination and ICSI to achieve the highest possibility in a successful reproduction. The authors believe that the use of HB-MaSC index could describe more precisely the male fertility potential as the previously used classic parameters and a potentially useful tool in the hands of andrologist in everyday andrological practice and before assisted reproductive techniques.

Acknowledgements

The authors would like to thank 'Férfigyógyászat Foundation' for their financial support to buy HBA tests and also want to thank Zsolt Karányi for the statistical analyses. In addition, we would like to express the deepest appreciation to Professzor Csaba Toth and Balazs Szoor for their guidance and suggestions till completion of this work.

References

- Abad C, Amengual MJ, Gosálvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, García-Peiró A, Prats J (2013) Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human

- sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia* 45:211–216.
- Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V, Dias JA, Abdelmassih R, Nagy ZP (2002) Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod* 17:2694–2699.
- Agarwal A, Said TM (2004) Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online* 8:376–384.
- Agarwal A, Sekhon LH (2010) The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil* 13:217–225.
- Agarwal A, Sekhon LH (2011) Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: Is it justified? *Indian J Urol* 27:74–85.
- Anagnostis P, Karras S, Goulis DG (2013) Vitamin D in human reproduction: a narrative review. *Int J Clin Pract* 67:225–235.
- Azizollahi G, Azizollahi S, Babaei H, Kianinejad M, Baneshi MR, Nematollahi-Mahani SN (2013) Effects of supplement therapy on sperm parameters, protamine content and acrosomal integrity of varicocelectomized subjects. *J Assist Reprod Genet* 30:593–599.
- Balercia G, Mosca F, Mantero F, Boscaro M, Mancini A, Ricciardo-Lamonica G, Littarru G (2004) Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertil Steril* 81:93–98.
- Busetto GM, Koverech A, Messano M, Antonini G, De Berardinis E, Gentile V (2012) Prospective open-label study on the efficacy and tolerability of a combination of nutritional supplements in primary infertile patients with idiopathic asthenoteratozoospermia. *Arch Ital Urol Androl* 84:137–140.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G (2004) Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 9:2052–2059.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16:231–245.
- Dokmeci D (2005) Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med* 47:26–30.
- Ergur AR, Dokras A, Giraldo JL, Habana A, Kovanci E, Huszar G (2002) Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertil Steril* 77:910–918.
- Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N (2012) Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res* 349:665–678.
- Hammoud AO, Meikle AW, Peterson CM, Stanford J, Gibson M, Carell DT (2012) Association of 25-hydroxy-vitamin D levels with semen and hormonal parameters. *Asian J Androl* 14:855–859.
- Hemingway RG (2003) The influences of dietary intakes and supplementation with selenium and vitamin E on reproduction diseases and reproductive efficiency in cattle and sheep. *Vet Res Commun* 27:159–174.
- Hunt CD, Johnson PE, Herbel J, Mullen LK (1992) Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *Am J Clin Nutr* 56:148–157.
- Huszar G (2012) Sperm testing and ICSI selection by hyaluronic acid binding: the hyaluronic acid coated glass slide and petri dish in the andrology and IVF laboratories. In: *Practical Manual of in Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A (eds). Springer, New York, NY, pp 241–257.
- Huszar G, Ozenci CC, Jakab A, Vigue L (2002) A double chamber device for advanced sperm testing: semen analysis and an assay for sperm maturity by hyaluronic acid (HA) binding. *J Androl (Suppl.)* 23(S1):55.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L (2003) Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 79(Suppl. 3):1616–1624.
- Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S (2006) Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:260–267.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S (2007) Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 14:650–663.
- Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G (2005) Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 84:1665–1673.
- Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL (1995) A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril* 64:825–831.
- Mongkolkehaipak S, Vutyavanich T (2013) No difference in high-magnification morphology and hyaluronic acid binding in the selection of euploid spermatozoa with intact DNA. *Asian J Androl* 15:421–424.
- Myles DG, Primakoff P (1997) Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 56:320–327.

- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalace M (2008) Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 25:197–203.
- Natali A, Turek PJ (2011) An assessment of new sperm tests for male infertility. *Urology* 77:1027–1034.
- Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS (2004) The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann NY Acad Sci* 1033:177–188.
- Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, Steeno O, Kruger T (1997) Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 12:987–993.
- Petrosian AM, Haroutounian JE (2000) Taurine as a universal carrier of lipid soluble vitamins: a hypothesis. *Amino Acids* 19:409–421.
- Redgrove KA, Nixon B, Baker MA, Hetherington L, Baker G, Liu D, Aitken RJ (2012) The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* 7:e50851.
- Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E (1999) Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod* 14:1028–1033.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW (1998) Hyaluronic acid enhances induction of the acrosome reaction of human sperm through interaction with the PH-20 protein. *Zygote* 6:103–111.
- Schaffer S, Takahashi K, Azuma J (2000) Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 19:527–546.
- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H (2005) Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 6:495–501.
- Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA (2001) Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and non-smokers. *Fertil Steril* 75:252–259.
- World Health Organization (2010) WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edn. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Wirleitner B, Vanderzwalmen P, Stecher A, Spitzer D, Schuff M, Schwerda D, Bach M, Schechinger B, Herbert Zech N (2012) Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization. *Int J Vit Nutr Res* 8:391–398.
- Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP (2002) Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 77:491–498.
- Worilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T, Lieberman J (2012) Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes-multicenter, double blinded and randomized trial. *Hum Reprod* 28:306–314.
- Yagci A, Nurk W, Stronk J, Huszar G (2010) Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl* 31:566–572.



Original article

Hyaluronan bound mature sperm count (HB-MaSC) is a more informative indicator of fertility than conventional sperm parameters: Correlations with Body Mass Index (BMI)



Miklos Szucs^a, Peter Osvath^a, Attila Jakab^b, Daniel Varga^c, Balazs Varga^c, Bela Juhasz^{c,*}

^a Department of Urology and Andrology, Keneszy Gyula University Hospital, University of Debrecen, H4001, Debrecen, Hungary

^b Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H4032, Debrecen, Hungary

^c Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H4032, Debrecen, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Sperm quality

BMI

HBA (hyaluronan binding assay)

HB-MaSC (hyaluronan bound matured sperm count)

ABSTRACT

The relationship between overweight and male fertility is well studied, still the correlation of obesity and decreased sperm quality is a subject to debate. The widely used conventional spermatological examinations alone seem to be inadequate to assess fertilization potential. Hyaluronan Binding Assay (HBA[®]) is one of the available validated tests that allows the functional examination of sperm. Data of 72 male patients (mean age 33.9 (24–43) years) from infertile couples were analysed. Body Mass Index (BMI) determination, conventional semen analysis and HBA were performed. Additionally, a relatively new Hyaluronan Bound Matured Sperm Count (HB-MaSC) -index, first introduced by the authors in 2015, was calculated. This index reflects fertilization potential of sperm more precisely. With the increase of BMI, sperm count decreased significantly until about 25 kg/m², above 25 kg/m² no further decrease was observed, although sperm count remained permanently low. Greater body weight (in the 70–90 kg range) was observed to have a significant negative effect only on the progressive sperm motility. In addition to sperm concentration and motility, sperm fertilization potential is also negatively affected by obesity, but is irrespective of body weight, as evaluated using BMI + HB-MaSC linear regression analyses adjusted for age and weight. This correlation between male BMI and sperm fertilization potential – as opposed to the conventional correlations with sperm concentration or motility – appears to provide more helpful information in the identification of real capability for fertilization.

1. Introduction

Obesity is one of the main healthcare problems in the Western world. According to the World Health Organization (WHO) the number of overweight adults is more than 1.9 billion, and the number of obese people is more than 650 million, based on data published in February 2018 [1].

The impact of overweight on male fertility is well studied and widely accepted, both in animal models and humans [2–8]. There are numerous studies confirming that body mass index (BMI), along with many other lifestyle factors (smoking, caffeine intake, drug abuse etc.), also have a negative impact on male fertility [9,10]. However, semen parameters may not have such a clear relation to it [11,12].

Recently, the value of the conventional spermatological examinations in assessing fertility status has been questioned [13]. Hyaluronan Binding Assay (HBA[®]) is one of the newly introduced tests that allows the functional examination of sperm. Theoretical basis of the HBA test

is that only mature sperm with low aneuploidy frequency and DNA fragmentation express hyaluronan-binding receptors (HBR) and can connect to the polysaccharide matrix of the cumulus cells, containing hyaluronic acid (HA, also called hyaluronan) [14–16]. Thus, only mature sperm are able to bind to the hyaluronic acid-treated surface in vitro in HBA assays - as to the pellucid zone in vivo -, which allows one to differentiate between mature and immature cells [17,18]. Sperm maturity, low aneuploidy and DNA fragmentation rate, increased chromatin integrity, normal head-morphology and consequently improved fertility potential, all correlate with binding ability to hyaluronic acid [16,19]. HA-based sperm selection improves the implantation rate and decreases the early pregnancy loss rate after ICSI, especially in case of decreased sperm HA binding capacity [20]. Hyaluronan Binding Assay is also useful in oligozoospermia, since it facilitates the choice between the subsequent IVF techniques.

The aim of the present study was to investigate and compare the effect of BMI on conventional semen parameters (sperm concentration

* Corresponding author at: H4032, Debrecen, Nagyterdei krt. 98, Hungary
E-mail address: juhasz.bela@med.unideb.hu (B. Juhasz).

<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.02.002>

Received 5 June 2018; Received in revised form 6 February 2019; Accepted 7 February 2019

Available online 14 February 2019

1642-431X/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Society for Biology of Reproduction & the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

and progressive motility) and fertilization potential based on hyaluronan binding.

2. Materials and methods

Seventy-two men were included (mean (range) age: 33.9 (24–43) years), who were referred for an andrological workup due to an infertile relationship that lasted for more than 12 months. For each patient we performed BMI calculation, physical and ultrasound testicular examination, microscopic semen analysis, and HA binding capacity. Hyaluronan Bound Matured Sperm Count (HB-MaSC) was also calculated [21].

Disorders that were medically or surgically treatable were part of the exclusion criteria. We excluded patients with clinically relevant varicocele, less than 25 cm³ testicular volume, and other known medical factors such as severe hormonal difference and regular smoking. We also excluded patients with teratozoospermia: normal sperm morphology below 4% - based on Krüger's strict criteria [22].

2.1. Body mass index

Although it does not reflect the real percentage of body fat, BMI is accepted and widely used in clinical research, as well as in andrological practice to assess the ideal weight and the extent of deviation from it. BMI is defined as the weight in kilograms divided by the height in meters squared (kg/m²), thus measuring BMI is cost-effective and easy to perform (Table 1).

For anthropometric data, the height and weight was measured with a height measure and scale, respectively, wearing light clothes, without shoes. BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters.

2.2. Semen analysis

All semen samples were collected in a private room near the laboratory after a 4-day abstinence by masturbation, and ejaculated into a clean plastic container, according to the WHO guidelines [22]. After liquefaction of fresh, untreated samples, the HBA test was performed first, according to the instructions of the manufacturer. Spermatological examinations of the semen samples like; sperm count, motility, morphology, vitality etc. were performed with full respect to, and following step-by-step instructions of the „WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen 5th edition" [22] using a bright field microscope (magnification ×200–400) and Makler counting chamber under constant conditions (at room temperature 10 µl drop of liquefied native semen were used). As the semen samples were assessed immediately there was no need to store them. During the procedures, standard room temperature was secured. Data collection and interpretation were also performed based on the standards of the same WHO manual for semen analysis. Categories of sperm movement were as follows: progressive motility (PR), when spermatozoa move actively regardless of speed either linearly or in a large circle, non-progressive motility (NP), when spermatozoa move without progression, and immotility (IM), which means no movement.

Table 1
Correlation between Body Mass Index and disease risk [23].

	Unit	Disease risk
Underweight	≤ 19.9 kg/m ²	Increased disease risk
Normal	20–24.9 kg/m ²	Normal
Overweight	25–29.9 kg/m ²	Increased disease risk
Class I obesity	30–34.9 kg/m ²	High disease risk
Class II obesity	35–39.9 kg/m ²	Very high disease risk
Class III obesity	≥ 40 kg/m ²	Extremely high disease risk

2.3. Hyaluronic binding assay (HBA)

The functional evaluation of sperm quality was performed with the commercially available HBA tests (Biocoat Inc, USA). The test was carried out according to the recommendation of the manufacturer. Briefly, 7–10 µl native semen was dropped onto hyaluronic acid coated slide and after 10–15 minutes of incubation at room temperature, the binding rate of sperms was determined.

2.4. Hyaluronan bound matured sperm count (HB-MaSC)

Combining the classical sperm parameters (sperm density, motility, morphology) with the results of the HBA test, the authors formerly described a new fertility index, called Hyaluronan Bound Matured Sperm Count (HB-MaSC), which stands for the multiplication of sperm density in one mL semen, the percentage of progressively motile sperm, and the percentile of moving sperms binding to hyaluronic acid [21], which was calculated from the available data.

2.5. Statistical analysis

The relationships between BMI and the outcomes of HB-MaSC, sperm count and progressive motility (WHO-PR) were evaluated using multiple linear regression adjusted for body weight and age. Variables were transformed to improve normality: HB-MaSC and sperm count were square-root transformed, WHO-PR was square transformed, and BMI was natural log transformed. The model contained first, second, and third power variants of log-BMI, and first and second power variants of body weight, to allow for curvatures in the relationship. Effects were expressed as marginal effects for a unit increase specifically to reference points across the BMI range, with 95% confidence intervals and p-values. Model fits were checked using Breusch-Pagan/Cook-Weisberg tests for heteroscedasticity, Ramsey's regression specification-error tests, and by inspection of normality of residuals and residuals-versus-fitted-values plots. The statistical package Stata was used for data handling and analysis. P values less than 0.05 were considered to indicate significance.

The procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional).

3. Results

Anthropometric data of the seventy-two infertile men included in the study are shown in Table 2.

Adjusted for age and body weight, regression fitted values of sperm count values were found to be the highest at the low end of the normal BMI range. The sperm count values decreased significantly with the increase of BMI until 25 kg/m², but over this BMI no remarkable changes were identified, as sperm counts varied to a non-significant extent around a constant low level of 30 million per ml (Figs. 1 and 2). This indicates that BMI in the overweight through the obese range is associated with a lower sperm count, compared to subjects close to the centre of the normal BMI range. The relationship is best established for body weights up to around 90 kg, but might not be true in case of heavier subjects, who were generally outside the normal BMI range in

Table 2
Anthropometric data of the 72 men included in the study.

	Mean	Range
Age (year)	33,85	24–43
Weight (kg)	90,43	60–135
Height (m)	1,80	1,61–2,00
BMI (kg/m ²)	27,94	19,15–49,22

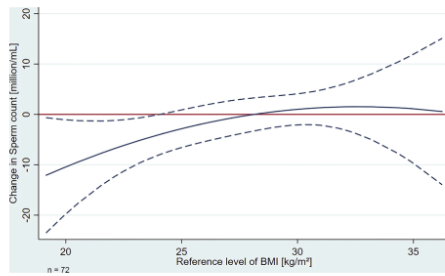


Fig. 1. Marginal effects of a unit increase in body mass index (BMI) on the expected value of change of sperm count. The relationships between BMI and change of sperm count were evaluated using multiple linear regression adjusted for body weight and age. In Stata statistical software model, fits were checked using Breusch-Pagan/Cook-Weisberg tests for heteroscedasticity, Ramsey's regression specification-error tests, and by inspection of normality of residuals and residuals-versus-fitted-values plots. Curves indicate marginal effect point estimates (solid line) with 95% confidence intervals (dashed lines) at reference levels of BMI as read against the horizontal axis. The estimates (solid line) differ significantly ($p < 0.05$) from any values that lie outside the 95% confidence interval (the area between the two dashed lines). Significantly negative values of sperm count-change can be seen at lower BMI values. $n = 72$.

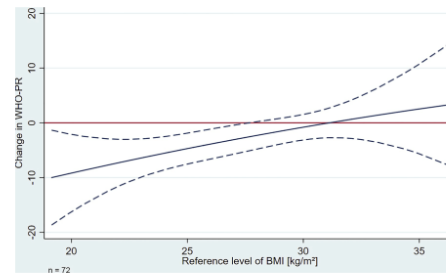


Fig. 3. Marginal effects of a unit increase in body mass index (BMI) on the expected value of change of progressive motility (measured according to the guidelines of the WHO) (WHO-PR). The relationships between BMI and change of WHO-PR were evaluated using multiple linear regression adjusted for body weight and age. In Stata statistical software model fits were checked using Breusch-Pagan/Cook-Weisberg tests for heteroscedasticity, Ramsey's regression specification-error tests, and by inspection of normality of residuals and residuals-versus-fitted-values plots. Curves indicate marginal effect point estimates (solid line) with 95% confidence intervals (dashed lines) at reference levels of BMI as read against the horizontal axis. The estimates (solid line) differ significantly ($p < 0.05$) from any values that lie outside the 95% confidence interval (the area between the two dashed lines). Significantly negative values of WHO-PR-change can be seen at lower BMI values. $n = 72$.

our sample (Fig. 2).

Similar tendencies were detected with progressively motile sperm rate (WHO-PR, according to WHO classification 2010 [22]), which decreased significantly with the increase of BMI across the normal to overweight range (Fig. 3) before leveling out in obese subjects. Adjusted for age and BMI, greater body weight, in the 70–90 kg range, was observed to have an elevating effect on WHO-PR, with an estimated

17.7 percentage points (95%CI 9.2–26.1, $p < 0.0001$) in 80-kg vs 70-kg, and 11.3 percentage points (95%CI 5.1–17.4, $p = 0.0003$) in 90-kg vs 80-kg subjects of the same age and BMI (Fig. 4). No outcome other than WHO-PR was observed to be significantly associated with body weight.

The age- and body weight-adjusted relationship between

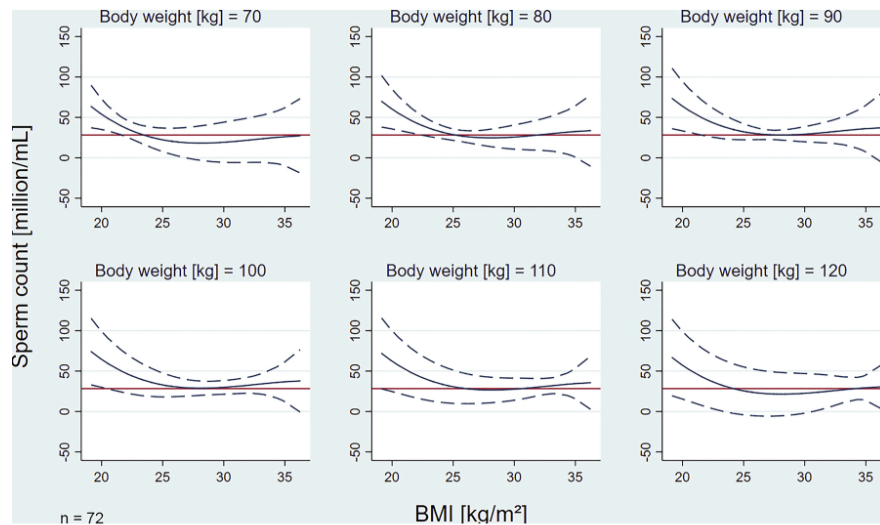


Fig. 2. Association between body mass index (BMI) and expected value of sperm count. The relationships between BMI and sperm count were evaluated using multiple linear regression adjusted for body weight and age. In Stata statistical software model fits were checked using Breusch-Pagan/Cook-Weisberg tests for heteroscedasticity, Ramsey's regression specification-error tests, and by inspection of normality of residuals and residuals-versus-fitted-values plots. Curves indicate fitted values (solid lines) with 95% confidence intervals (dashed lines) at sample mean age at different body weight levels as indicated above each insert; horizontal line indicates fitted value at sample mean levels of all explanatory variables. The fitted values (solid line) differ significantly ($p < 0.05$) from any values that lie outside the 95% confidence interval (the area between the two dashed lines). At lower body weight there are some low BMI values, where sperm count differs significantly positively from the sample mean (horizontal line), however at higher BMI values sperm count values do not reach physiological levels and settle around the low sample mean regardless of weight. $n = 72$.

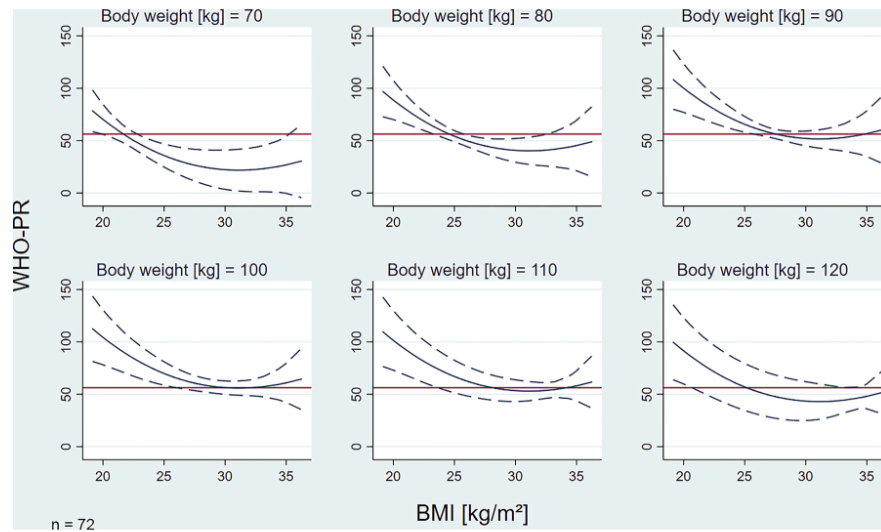


Fig. 4. Association between body mass index (BMI) and expected value of progressive motility (measured according to the guidelines of the WHO) (WHO-PR). The relationships between BMI and WHO-PR were evaluated using multiple linear regression adjusted for body weight and age. In Stata statistical software model fits were checked using Breusch-Pagan/Cook-Weisberg tests for heteroscedasticity, Ramsey's regression specification-error tests, and by inspection of normality of residuals and residuals-versus-fitted-values plots. Curves indicate fitted values (solid lines) with 95% confidence intervals (dashed lines) at sample mean age at different body weight levels as indicated above each insert; horizontal line indicates fitted value at sample mean levels of all explanatory variables. The fitted values (solid line) differ significantly ($p < 0.05$) from any values that lie outside the 95% confidence interval (the area between the two dashed lines). At low BMI values (regardless of weight) WHO-PR values may be higher than the sample mean, however with the increasing BMI WHO-PR values are shown to be lower and generally do not differ significantly from the low sample mean. But for example at 80 kg body weight and 28–30 kg/m² BMI, values of WHO-PR even significantly negatively differ from sample mean. $n = 72$.

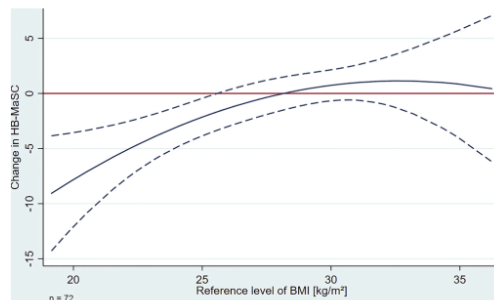


Fig. 5. Marginal effects of a unit increase in body mass index (BMI) on the expected value of change of Hyaluronan Bound Matured Sperm Count (HB-MaSC). The relationships between BMI and change of HB-MaSC were evaluated using multiple linear regression adjusted for body weight and age. In Stata statistical software model fits were checked using Breusch-Pagan/Cook-Weisberg tests for heteroscedasticity, Ramsey's regression specification-error tests, and by inspection of normality of residuals and residuals-versus-fitted-values plots. Curves indicate marginal effect point estimates (solid line) with 95% confidence intervals (dashed lines) at reference levels of BMI as read against the horizontal axis. The estimates (solid line) differ significantly ($p < 0.05$) from any values that lie outside the 95% confidence interval (the area between the two dashed lines). Significantly negative values of HB-MaSC-change can be seen at lower BMI values. $n = 72$.

BMI + change of HB-MaSC (Fig. 5) has similar features as BMI + change of sperm count linear regression analyses. Values of HB-MaSC were found to be higher, at lower BMI values, decreasing steadily until

25 kg/m² BMI. This decrease is even steeper than what could be observed in case of sperm count, which may suggest, that the BMI + HB-MaSC relationship is more sensitive in illustrating the effect of BMI. Above 25 kg/m² BMI, no further decrease in HB-MaSC index was seen, it remained at a low level which proved to be characteristic for the overweight to obese BMI-range. Body weight seems to be not as tightly related with changes of this index as BMI. Although, in the 70–100 kg range, greater body weight showed some tendency to exert an elevating effect on HB-MaSC, but this proved to be statistically non-significant. The relationship between BMI + HB-MaSC is best established for body weights up to around 100 kg (Fig. 6).

Model fit was found sufficient in all cases, with acceptable minor deviations from normality of residuals in the models for HB-MaSC, sperm count, and WHO-PR; no evidence of poor fit was found for any outcome with other model checking methods.

4. Discussion

It has been shown recently that the functional examination of sperm may be important in the identification of clinical infertility [13]. However, there is meager experimental data available describing the effect of BMI on the functional characteristics of sperm. In this study, we investigated and compared the effects of BMI on conventional sperm parameters (sperm count and progressive motility) and fertilization potential based on hyaluronan binding by evaluating data of 72 infertile men using multiple linear regression analyses adjusted for body weight and age.

Although some relationship between BMI and male infertility has been confirmed [9,10], BMI and semen parameters may not be so clearly related: previous clinical studies reported conflicting results on the impact of overweight on sperm count. Based on the work of Nguyen

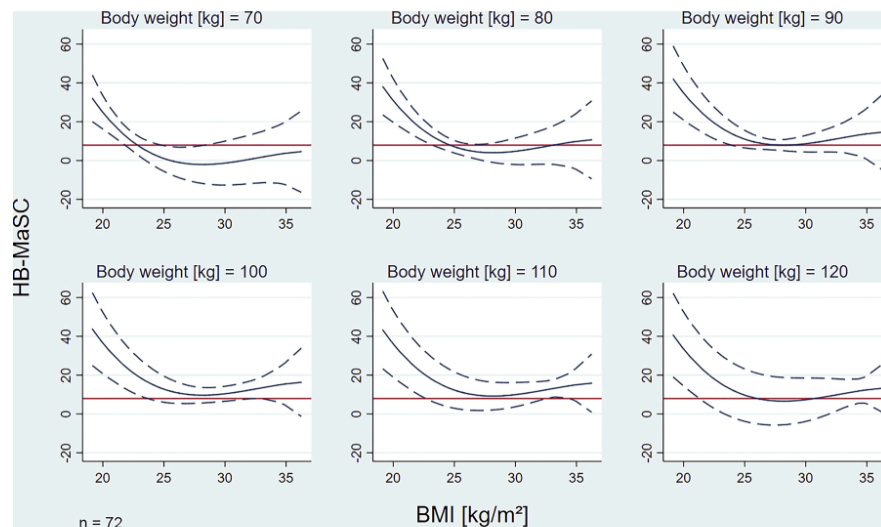


Fig. 6. Association between body mass index (BMI) and expected value of Hyaluronan Bound Matured Sperm Count (HB-MaSC). The relationships between BMI and HB-MaSC were evaluated using multiple linear regression adjusted for body weight and age. In Stata statistical software model fits were checked using Breusch-Pagan/Cook-Weisberg tests for heteroscedasticity, Ramsey's regression specification-error tests, and by inspection of normality of residuals and residuals-versus-fitted-values plots. Curves indicate fitted values (solid lines) with 95% confidence intervals (dashed lines) at sample mean age at different body weight levels as indicated above each insert; horizontal line indicates fitted value at sample mean levels of all explanatory variables. The fitted values (solid line) differ significantly ($p < 0.05$) from any values that lie outside the 95% confidence interval (the area between the two dashed lines). At low BMI values (regardless of weight) HB-MaSC values may be higher than the sample mean, however with the increase of BMI values of HB-MaSC are shown to be lower and do not differ significantly from the low sample mean regardless of weight. $n = 72$.

et al. there may be some relationship between male infertility and BMI: obese men were found to be 3.5 times more likely to have oligospermia than those with normal BMI, confirming the negative impact of BMI on male fertility [24]. Also, according to a meta-analysis of 21 studies by Sermondade and others, overweight and obesity were associated with an increased prevalence of azoospermia or oligozoospermia with a J-shaped relationship [25].

In contrast, a number of clinical studies question the direct relation between subfertility and obesity. Chavarro et al. found that despite major differences in reproductive hormone levels with increased body weight, only extreme levels of obesity ($\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$) influenced the sperm count and motion parameters negatively [26]. In a meta-analysis of 5 studies, MacDonald and others found no evidence of an association between increased BMI and semen parameters [12].

As opposed to this, according to our results, increased BMI (25 kg/m^2) (Figs. 1 and 2), but not the body weight itself (Fig. 2), negatively affects sperm count. In case of progressive motility, increased BMI was observed to have a negative effect on WHO-PR as well (Figs. 3 and 4). On the other hand, higher body weight seem to produce a less pronounced decreasing effect on WHO-PR – if we compare graphs of 70–100 kg range (Fig. 4) –, however in even higher body weights (above 100 kg) the negative effects intensify again (not significantly). Although the same tendency can be seen in case of sperm count + body weight and HB-MaSC + body weight relationships as well, the significantly weakening impact of increasing body weight on WHO-PR-decrement. Proved to be an isolated instance: no outcome other than WHO-PR was observed to be significantly associated with body weight. We found that the negative impact of BMI-increase on sperm quality reaches a plateau above $28\text{--}30 \text{ kg/m}^2$, since the sperm concentration, locomotor capacity and hyaluronan-binding do not decrease further above this BMI value.

In our experiment, progressive motility was observed to be related

to BMI, however, this relationship has contradictions in the scientific literature, as it was mentioned in the case of BMI + sperm count. A recent article of Ramaraju et al. discusses results of computer-aided sperm analysis, the final conclusion of which is that obesity (BMI over 30 kg/m^2) is associated with lower progressive motility [27]. In contrast, an investigation by Keskin and colleagues, concluded without affirmation of such relationship, although they found BMI to be negatively correlated with prolactin and testosterone levels [28].

Recent research showed that although BMI has an overall impact on the success of In Vitro Fertilization (IVF), it does not affect pregnancy rate in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles [29]. Regarding the results of assisted reproductive techniques, Thomsen et al. found, that fertilization rate, number of good quality embryos, implantation rate, and pregnancy outcome was not influenced by male BMI [30]. Also, they did not find any effect of BMI on conventional semen parameters.

Thus, several new tests for the functional examination of sperm had to be researched, due to the insufficiency of classical spermatological examinations in determining male fertility. The impact of obesity on male fertility, may be better elucidated by investigating the association between BMI and sperm functional variables, rather than conventional semen parameters.

The Hyaluronan Binding Assay (HBA) is a relatively new functional test assessing fertilization capability of sperm [21]. However, there is limited data on the relationship between overweight and sperm hyaluronan binding capacity. Sermondade et al. assessed the relations between male BMI, conventional semen parameters and zona pellucida binding capacity and they found no correlation [11]. On the other hand, Wegner et al. found that tobacco use and abnormally high BMI together, are associated with lower hyaluronan binding capacity [31]. Our results demonstrated that high BMI alone could contribute to male infertility: increasing BMI negatively affects hyaluronan binding

capability of spermatozoa, even if above 25 kg/m² this gets stabilized on a persistently low level. Body mass index seems to be a preferable candidate to compare HBA results with, as opposed to body weight, in case of which the former relationship is not well established in our experiment. It is even better if we compare BMI with another index related with HA binding results, the Hyaluronan Bound Matured Sperm Count (HB-MaSC), formerly introduced by the authors [21], as combined interpretation of conventional and functional sperm parameters may improve clinical utility. This recently described fertility index takes sperm density, progressive motility, and HA binding capacity into consideration, as the presence of sufficient motile spermatozoa is a prerequisite for HA binding. Using this parameter in the present study, we found that after disregarding body weight, the effect of increased BMI on sperm quality is even more pronounced if HB-MaSC is considered.

The background mechanisms of the negative impact of obesity on spermatogenesis, and testicular function, have been investigated by several researchers: increased sperm oxidative stress [2,32], altered concentrations of hormones or related proteins (testosterone, estrogen, leptin, Sexual Hormon Binding Globulin (SHBG), aromatase enzyme) [26,33–37], molecular processes (like methylation, acetylation and changes in RNA and small non-coding RNA levels) [33], or even increased testicular temperature due to overweight, may all be related to obesity influencing fertility status [38].

Certainly, male infertility has multifactorial environmental, and life-style related etiology, which all can modify the effect of overweight.

There are few limitations of this study. Since the data collection was performed in an outpatient andrological office, we have limited data on female fertility factors. As the routine andrological examination includes hormonal determination only in case of severe pathozoospermia or testicular deficiency, the association between reproductive hormone levels and HBA or BMI was not assessed in the present study.

In conclusion, the present study provides analysis of the effect of obesity on the hyaluronan binding capacity of sperm from non-smoking, infertile men for the first time, to the best of our knowledge. Our results suggest that influence of body weight-changes on hyaluronan binding is less, than that of BMI, i.e. increase of BMI alone (without tobacco-use) correlates better with infertility than body weight-increase, which is also novel. Our results represent the first demonstration of BMI + HB-MaSC correlation. This relationship not only correlates well with BMI + sperm count, but also seemed to be slightly more sensitive to BMI-increase. What is even more advantageous, is that our calculation method takes sperm function into consideration as it uses sperm density, progressive motility, and HA binding capacity values at the same time, thus, it provides additional information. HB-MaSC reflects a more explicit relationship between obesity and infertility, than body weight or classical spermatological indices. Thus, despite the contradictions in the scientific literature regarding sperm count and motility correlations, we suggest the use of the HB-MaSC index, which combines conventional and functional sperm parameters, for the assessment of fertility status.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank *Laszlo Kardos* M.D. for the statistical analysis. We also would like to express our deepest appreciation to *Prof. Csaba Toth*, for keeping us motivated, and to *Balazs Szoor* for his guidance and suggestions. This study was supported by GINOP-2.3.4-15-2016-00002 (B.V. and B. J.) and 20428-3/2018/FEKUTSTRAT (B.V. and B. J.). The authors would like to thank our native english-language colleague, *Nora Hollos*, for her hard work in proofreading and revising english language issues in the manuscript.

References

- [1] Organization WH. Obesity and overweight (18 Sep 2018). <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- [2] Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 2011;34:402–10.
- [3] Cabler S, Agarwal A, Flint M, du Plessis SS. Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian J Androl* 2010;12:480–9.
- [4] Fejes I, Koloszar S, Szollosi J, Zavaczki Z, Pal A. Is semen quality affected by male body fat distribution? *Andrologia* 2005;37:155–9.
- [5] Hajshafhiha M, Ghareghaji R, Salemi S, Sadegh-Asadi N, Sadeghi-Bazargani H. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples. *Int J Gen Med* 2013;6:447–51.
- [6] Hakonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, Andersen CY, et al. Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reprod Health* 2011;8:24.
- [7] Koloszar S, Fejes I, Zavaczki Z, Daru J, Szollosi J, Pal A. Effect of body weight on sperm concentration in normozoospermic males. *Arch Androl* 2005;51:299–304.
- [8] Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006;27:450–2.
- [9] Campagne DM. Can male fertility be improved prior to assisted reproduction through the control of uncommonly considered factors? *Int J Fertil Steril* 2013;6:214–23.
- [10] Holden CA, McLachlan RI, Pitts M, Cumming R, Wittert G, Ehsani JP, et al. Determinants of male reproductive health disorders: the men in australia telephone survey (mates). *BMC Public Health* 2010;10:96.
- [11] Sermondade N, Dupont C, Faure C, Boubaya M, Cedrin-Durnerin I, Chavatte-Palmer P, et al. Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile males. *Asian J Androl* 2013;15:626–9.
- [12] Macdonald AA, Stewart AW, Farquhar CM. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in new zealand men: a cross-sectional study in fertility clinics. *Hum Reprod* 2013;28:3178–87.
- [13] Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 1997;12:987–93.
- [14] Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril* 1994;61:136–42.
- [15] Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol Reprod Dev* 1994;38:69–76.
- [16] Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665–73.
- [17] Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V, Dias JA, Abdelmassih R, Nagy ZP. Laser-assisted icsi: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod* 2002;17:2694–9.
- [18] Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:260–7.
- [19] Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 3):1616–24.
- [20] Worrilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, et al. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (icsi): significant improvement in clinical outcomes—multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2013;28:306–14.
- [21] Szucs M, Osvath P, Laczkó I, Jakab A. Adequacy of hyaluronan binding assay and a new fertility index derived from it for measuring of male fertility potential and the efficacy of supplement therapy. *Andrologia* 2015;47:519–24.
- [22] Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World health organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;16:231–45.
- [23] Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults—the evidence report. National Institutes of health. *Obes Res* 1998;6(Suppl 2):51S–209S.
- [24] Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD. Men's body mass index and infertility. *Hum Reprod* 2007;22:2488–93.
- [25] Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. Bmi in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;19:221–31.
- [26] Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010;93:2222–31.
- [27] Ramaraju GA, Teppala S, Prathigudupu K, Kalagara M, Thota S, Kota M, et al. Association between obesity and sperm quality. *Andrologia* 2018;50.
- [28] Keskin MZ, Budak S, Aksoy EE, Yucel C, Karamazak S, Ilbey YO, et al. Investigation of the effect of body mass index (bmi) on semen parameters and male reproductive system hormones. *Arch Ital Urol Androl* 2017;89:219–21.
- [29] Keltz J, Zapanis A, Jindal SK, Lieman HJ, Santoro N, Polotsky AJ. Overweight men: clinical pregnancy after art is decreased in ivf but not in icsi cycles. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:539–44.
- [30] Thomsen L, Humaidan P, Bungum L, Bungum M. The impact of male overweight on