

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Humán spermiumok megtermékenyítő képességének új vizsgálati - és kezelési lehetőségei

Dr. Szűcs Miklós

Témavezetők:

Dr. Juhász Béla

Dr. Jakab Attila



Debreceni Egyetem

Táplálkozás – és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Humán spermiumok megtermékenyítő képességének új vizsgálati - és kezelési lehetőségei

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Táplálkozás - és Élelmiszertudományok tudományágban

Írta: Dr. Szűcs Miklós

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás - és Élelmiszertudományok
Doktori Iskolája
(Táplálkozástudományi doktori programja) keretében

Témavezetők: Dr. Juhász Béla, PhD
Dr. Jakab Attila, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bácskay Ildikó, PhD
Dr. Pósa Anikó, PhD

A doktori védési bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Páll Dénes, az MTA doktora
opponensek:	Prof. Dr. Bácskay Ildikó, PhD Dr. Pósa Anikó, PhD
tagok:	Prof. Dr. Bajory Zoltán, az MTA doktora Dr. Felszeghy Enikő, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2020 október 22., 12.00.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a juhasz.bela@med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2020. október 21.) 12.00. óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	1
1.1	A meddőség történelmi aspektusai	1
1.2	A mesterséges megtermékenyítés története	2
1.3	A hímivarsejtek működését károsító tényezők	3
1.3.1	Elhízás	3
1.3.2	Varicocele.....	3
1.3.3	Genetikai eltérések	4
1.3.4	Obstrukció	4
1.3.5	Hereleszállási zavarok	5
1.3.6	„Idiopátiás férfi meddőség”	5
1.4	Az oxidatív stressz hatása a spermiumok megtermékenyítő képességére	5
1.5	Mikronutriensek szerepe a fertilitásban.....	6
1.6	Az andrológia mint tudományág	6
1.7	A klasszikus spermavizsgálati paraméterek és a funkcionális vizsgálatok az andrológiai kivizsgálásban.....	6
1.8	A funkcionális tesztek szerepe a modern andrológiai kivizsgálásban	7
1.8.1	Spermium penetrációs teszt.....	7
1.8.2	Spermium-zona pellucida kötési tesztek	7
1.8.3	Hipo-ozmotikus duzzadás teszt	8
1.8.4	DNS fragmentációs tesztek	8
1.8.5	Hyaluronsav-kötési assay (HBA®)	8
2	Célkitűzések.....	10
3	Betegek és módszerek	11
3.1	Testtömegindex	12
3.2	Ondóvizsgálat	13
3.3	Hyaluronsav-kötési assay (HBA®)	13
3.4	Hialuronánhoz kötődő érett spermiumok száma (HB-MaSC).....	13
3.5	Statisztikai elemzés.....	14
4	Eredmények	14
4.1	HBA-pontszám és HB-MaSC klinikailag infertilis férfiaknál.....	14
4.2	A spermiumparaméterek, a HBA-pontszám és a HB-MaSC változásai kiegészítő kezelés után..	14
4.3	Hialuronánhoz kötődő érett spermiumok számának (HB-MaSC) korrelációja a testtömegindexszel (BMI).....	15
5	Megbeszélés.....	16
6	Összefoglalás	19
7	Tárgyszavak.....	20
8	Köszönetnyilvánítás.....	24

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. 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. 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. 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). 1824-ben Jean-Louis Prévost és Jean-Baptiste-André Dumas bizonyították, hogy a spermiumok szükségesek a megtermékenyítéshez: 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. Magának az ejakulátumnak tudományos elemzésére és így annak minőségének esetleges javítására való igény a 1900 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. 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 1951-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.

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. Az első sikeres, azaz egészséges élő gyermek születésével járó humán in vitro fertilizációt (IVF) 1978-ban Steptoe és Edwards végezte egy petevezeték elzáródással diagnosztizált nőbetegen.

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. 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 azoospermia 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, illetve a beavatkozás történhet mikroszkópos műtéti eljárással (Microdissection Testicular Sperm Extraction (micro-TESE)).

1.3 A hímivarsejtek működését károsító tényezők

A spermiumok termelődése, érése és megtermékenyítő képessége számos szervezeten belüli és szervezeten kívüli ágenstől 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.

1.3.1 Elhízás

Az elhízás a nyugati világ egyik fő egészségügyi problémája. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint, 2016 februárjában közzétett adatok alapján, a túlsúlyos felnőttek száma meghaladja az 1,9 milliárdot, az elhízott emberek száma pedig a 650 millió főt. A túlsúlyosságnak a férfiak nemzőképességére kifejtett hatását mind állati modelleken, mind emberekben alaposan tanulmányozták, és tényét széleskörűen elfogadták. Számos tanulmány alátámasztja, hogy a testtömegindex (BMI=Body Mass Index) sok egyéb életmódbeli tényezővel együtt (dohányzás, koffeinbevitel, kábítószer-használat, stb.) szintén negatív hatással van a férfiak termékenységére.

1.3.2 Varicokele

A varicokele a plexus pampiniformis abnormális tágulata, mely a vér visszafele áramlását okozza. Hátterében a vénabillentyűk hiánya, vagy elégtelensége, illetve a jobb és bal oldali vena spermatica közti anatómiai eltérés állhat. 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. A varicokele az egyik leggyakoribb oka a férfi meddőségnek. A teljes felnőtt férfit populációban mintegy 20%-os

gyakorisággal fordul elő és elérheti a 40%-ot a meddő férfiak körében. Minemellett összefüggés mutatható ki a spermiumtermelés károsodása és a varicokele súlyossági fokozata között.

1.3.3 Genetikai eltérések

A férfi meddőség hátterének mintegy 10–15%-ában kromoszómaeltérések és génmutációk állnak.

Klinefelter-szindróma: a leggyakoribb nemi kromoszóma rendellenesség. Ezen betegeknél a Leydig sejt funkció károsult, kisméretűek a herék, a fenotípusukban pedig az androgén deficiencia mutatkozik meg.

Sertoli cell only (SCO)- szindróma esetén a herékből hiányzik a csírasejtet termelő hám. Az elváltozás érintheti az egyik, vagy mindkét oldali herét.

Y-kromoszóma mikrodeléció: A férfi meddőség hátterében egyik leggyakoribb 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. Fontos tudni, hogy a deléció sikeres intracitoplazmatikus iniciálás (ICSI) során a fiú utódban is jelen lesz.

Kallmann-szindrómában urológiai szempontból hypogonadotrop hypogonadizmus, hereleszállási zavar, egyoldali veseaplasia fordulhat elő.

Cisztás fibrózis 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.

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.

1.3.4 Obstrukció

Obstruktív azoospermia során az ondóban spermium nem található. Az ondóutak elzáródása a herétől a mellékherén, vas deferensen keresztül a ductus ejaculatoriusokig tartó szakaszon fordulhat elő. Az intratesticularis obstruktio kezelésében csak a TESE jön szóba, azonban mellékhere obstrukciónál MESA ajánlott. Vas deferens szintjében található elzáródás esetében

vasovasostomia, a ductus ejaculatoriusok obstrukciója esetén pedig az ejaculatorius ductusok transurethralis rezekciója (transurethral resection of the ejaculatory ducts – TURED) javasolt.

1.3.5 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%). Kétoldali hereleszállási zavar esetén azonban a spermatogenezis túlnyomó többségben károsodott, a fertilitási képesség ezeknél a betegeknél 35–53%-ra csökken.

1.3.6 „Idiopátiás férfi meddőség”

A férfigeddőség legalább 44% -ában nem találtak egyértelmű okot a meddőségre. Ezekben az esetekben sokszor valószínűsíthető valamilyen – akár átmeneti – funkcionális károsodás (hőhatás, stb) Az utóbbi időben egyre nagyobb figyelem irányul az oxidatív stressz okozta károsodásra.

1.4 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, valamint a férfiak reproduktív szerveiben gyarapodó reaktív molekulák (oxigéngyökök, OH) károsíthatják a spermiumok sejtmembránját, ez pedig számottevően csökkent megtermékenyítő-képességhez vezet. Az antioxidáns-terápia ezért inkább figyelmet kap, mivel hasznos lehet az oxidatív stressz okozta infertilitás kezelésében. Az antioxidáns-terápia javíthatja a spermiumkoncentrációt és -motilitást, és mindemellett csökkentheti a DNS-fragmentáció mértékét is a spermiumban.

1.5 Mikronutriensek szerepe a fertilitásban

Az antioxidáns hatású C és E vitamin a spermiumok membránkárosodását okozó ROS ellen lép fel, ezáltal javíthatja a fertilitási képességet. Több tanulmány is igazolta, hogy a D vitamin jó hatású a férfi megtermékenyítő képességre, valószínűleg a spermiumok mozgásának javítása miatt. Ugyancsak antioxidáns és emellett homocisztein-toxicitás gátló hatása van a B12 vitaminnak. Az aminosav terápia hatékonysága abból adódik, hogy, az aminosavak egyrészt a spermiumok mozgékonyosságában szerepet játszó struktúrfehérjék alkotói, másrészt megkötik a toxikus nehézfém ionokat, ezáltal védik a spermiumokat. Ezért alkalmazható pl. az arginin a spermiumok motilitásának fokozására, valamint jól ismert a karnitin fontos szerepe a spermiumok érési folyamataiban is. A taurinnak leírták, hogy antioxidáns hatása mellett az FSH és tesztoszteron szekréciót fokozó hatása révén pozitív hatása van a spermium paraméterekre is. Cink kezelés hiányában a spermiumok érése, azok száma és mozgékonyága is zavart szenvedhet. Napjainkban több olyan komplex készítmény is elérhető, amely egy tablettában tartalmazza a jótékony hatású vitaminokat, aminosavakat, nyomelemeket, melyek hasznos kiegészítői lehetnek a férfimedddőség terápiájának.

1.6 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 medddőség gyógyszeres és operatív kezelését, a férfi fogamzásgátlás problémakörét, és az utóbbi időben a mesterséges megtermékenyítési eljárások elterjedésével azok obligát feltételévé vált.

1.7 A klasszikus spermavizsgálati paraméterek és a funkcionális vizsgálatok az andrológiai kivizsgálásban

A spermatológia, mint a klasszikus kivizsgálási metódus, alapvizsgálat a férfi infertilitás kivizsgálásában, 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. 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 ICSI 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.

1.8 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.

1.8.1 Spermium penetrációs teszt

Az egyik első kifejlesztett funkcionális vizsgálat a spermium-penetrációs vizsgálat (SPA) volt. A vizsgálat a spermiumok kapacitációs képességét, az akroszóma reakciót, az oolemmával való fúziót és azon való áthatolást, valamint a hőröcsög oociták citoplazmájában történő dekondenzációs képességet méri.

1.8.2 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, ám mindegyik elsődleges eredményként értékeli a spermiumok szoros kötődését a ZP-hoz. Fontos megjegyezni még, hogy magas prediktív értékeket mutattak ki a sikeres inszeminációs és in vitro fertilizációs kimenetekre.

1.8.3 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 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.

1.8.4 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.

1.8.5 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[®]), amelynek elvégzése egyszerű, ám igen hatékonynak bizonyult a tervezett asszisztált reprodukciós beavatkozás előtt. 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. Csak a hyaluronsav kötő receptorokat (HBR) expresszáló, érett spermiumok képesek a hyaluronsavat tartalmazó poliszacharid mátrixból álló cumulus sejtjeihez kapcsolódni – hasonlóképp, mint in vivo a zona pellucidához –, ami egy új lehetőséget jelent az érett és az éretlen sejtek megkülönböztetésére.

A hyaluron-kötéssel elvégzett spermiumszelekció egy biztonságos és ígéretes spermiumszelekciós módszer az intracitoplazmatikus spermiuminjekció hatékonyságának javítására, ami elvezetett az „intracitoplazmatikus spermiuminjekcióra kiválasztva”

(Physiological ICSI / Picked for Intracytoplasmic Sperm Injection, PICSi®, Biocoat Inc., Horsham, PA, USA) módszer klinikai gyakorlatba történő bevezetéséhez. Ez a kiválasztás hatékonyan csökkenti a számbeli kromoszomális rendellenességek utód felé történő átadásának kockázatát is, 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. Kiterjedt, jól tervezett tanulmányok megállapították, hogy a terhesség elvesztésének aránya szignifikánsan magasabb volt, ha az eljárás előtti HA-kötődés 65% alatt volt, így a hialuronán-kötés alsó referenciahatárát 65%-nak tekintjük.

2 Célkitűzések

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 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 férfimeddőség 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 alkalmasságának a kvantifikálására olyan paraméterek a 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. 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[®]-teszttel 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. Ebben a 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). Az étrend-kiegészítő terápia legalább három, legfeljebb hat hónapig tartott a beteg-együtműködéstől 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 jelentkeztek.

A spermológiai 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.

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 hialuronsavhoz kötődő, mozgó spermiumok percentilisének szorzatát adja meg. A progresszivitást (PR) a WHO kézikönyvének (2010) kritériumai szerint határoztuk meg 10^6 / ml mértékegységben.

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

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

A statisztikai tesztek 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. A gyógyszeresen vagy sebészileg kezelhető rendellenességek a kizárási kritériumok részét képezték. Kizártuk azokat a betegeket is, akiknél klinikai jelentőséggel bíró varicokele, 25 cm^3 -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.

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/m^2), így a BMI mérése költséghatékony és könnyen kivitelezhető. Az antropometriai adatokhoz, melyekből kiszámoltuk a BMI-t, a magasságot és a testtömeget magasságmérővel,

illetve mérleggel mértük.

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. 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” 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 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, 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 teszttel 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. 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 ($10^6/\text{ml}$) $24,95 \pm 2,91$ 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 ($p = 0,00805$).

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 ($p = 0,000004$).

A számított HB-MaSC-érték ($10^6/\text{ml}$) $5,38 \pm 0,86$ (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 ($p = 0,000015$).

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.

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

A második vizsgálatban, 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/m^2 -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. 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.

Hasonló tendenciákat észleltünk a progresszíven mozgó spermiumok arányában (WHO-PR), amely szignifikánsan csökkent a BMI emelkedésével a normálistól a túlsúlyosig terjedő BMI-tartományban, 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. A WHO-PR-en kívül más eredménynél nem volt megfigyelhető szignifikáns összefüggés a testtömeggel.

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 elemzései. A HB-MaSC értékei magasabbnak bizonyultak alacsonyabb BMI-értékeknél, és egyenletesen csökkentek 25 kg/m^2 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/m^2 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.

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. 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. Ennél fogva, 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. 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. 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.

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 az egy ml 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 ICSI közötti választásban, hogy a legjobb eséllyel ériék el a sikeres reprodukciót. 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 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.

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

Eredményeink szerint a megnövekedett BMI (25 kg/m^2) negatív hatással van a spermiumszámra, maga a testtömeg viszont nem. A progresszív motilitás esetében a megnövekedett BMI negatív hatását figyeltük meg a WHO-PR-re is. 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 –, 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 esetben 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 28–30 kg/m² fölött platót ér el, mivel a spermiumkoncentráció, a mozgásképeség és a hialuronánhoz való kötődés nem csökken tovább a 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.

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 hialuronsav-kötési assay egy viszonylag új funkcionális teszt a spermium megtermékenyítő-képességének értékelésére. Mindazonáltal korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre a túlsúlyosság és a spermiumok hialuronán-kötési kapacitásának kapcsolatáról. 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 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.

Jelen tanulmányunk 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 amit a BMI fejt ki rá, azaz a BMI növekedése önmagában

(dohányzás nélkül) jobban korrelál az infertilitással, mint a testtömeg növekedése. 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 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. 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 egy ml 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 Tárgyszavak

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

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



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., Ruzs, 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 mikrodélécio kimutatása.
Magyar Urol. 15, 182-184, 2003.
15. Flaskó, T., Varga, A., Tállai, B., Salah, M. A., **Szűcs, M.**, Tóth, G., Tóth, C.: Laparoskopos műteteinkkel 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 azoospermiás esetekben.
Endosc. Minim. Invazív Ter. 4 (4), 65-66, 2001.
20. Kőrösi, 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 lymphadenectomy 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 alapjául szolgáló közleményekre):
3,303**

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

Debrecen, 2020.07.07.



8 Köszönetnyilvánítás

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Táplálkozás-és Élelmiszertudományi Doktori Iskola egyéni felkészülési hallgatójaként készítettem. Köszönet Prof. Dr. Szilvássy Zoltán, egyetemi tanár, Rector 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. Szöör 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.