

Spermium-DNS-fragmentáció a nőgyógyászati oldalról megközelítve



Máté Gábor dr., Török Attila dr.

Pannon Reprodukciós Intézet, Tapolca (Igazgató: Dr. Török Attila, egyetemi magántanár)

Számtalan olyan eset adódhat munkánk során, amikor egyszerűen nem tudjuk megmagyarázni, hogy egy-egy meddőségi kezelésben részt vevő pár esetében miért nem sikerül a fogantatás, vagy ha megtörténik is, akkor majdnem minden esetben vetéléssel végződik. A korábbiakban ilyenkor általában immunológiai és genetikai irányba tapogatóztunk, de a molekuláris biológiai módszerek fejlődésével új távlatok nyílnak előttünk. Ennek egyik alternatívájaként szolgálhatnak a különféle spermium-DNS-fragmentációs vizsgálati módszerek és berendezések, illetve a hozzájuk kapcsolódó spermiumszeparálási eljárások. Az andrológiai oldalt kicsit mellőzve a spermium-DNS-fragmentáció potenciális jeleit a nőgyógyászati oldalról igyekeztük felvázolni, bemutatva az intézetünkben is alkalmazott indikációs protokollt, a vizsgálatainkhoz használt SCD-assay-t, valamint a magas fragmentációs indexnél használt spermiumszeparálási technikákat.

Kulcsszavak: meddőség, spermium-DNS-fragmentáció, spermiumszeparálás

Sperm DNA fragmentation and its gynecological indicators

There are several cases during the infertility treatments of couples where we are unable to explain the recurrent implantation failure or if pregnancy occurs, it almost always results in a miscarriage. Earlier in such cases we usually looked for an immunological or a genetic discrepancy but with the development of molecular biological methods new perspectives have become an option. Alternatively, various sperm DNA fragmentation assays, equipment's and sperm separation methods can be used. Slightly neglecting the andrological side we tried to outline the potential signs of sperm DNA fragmentation from the gynecological side presenting the indication protocol used in our institute: the SCD assay is used for our studies and sperm separation techniques are used at high fragmentation index.

Keywords: infertility, sperm DNA fragmentation, sperm separation

Bevezetés

A meddőségi központokban elvégzett IVF/ICSI-beavatkozások (IVF: in vitro fertilizáció; ICSI: intracitoplazmatikus spermiuminjektálás a petesejtbe) során számtalanszor találkozunk olyan esettel, amikor a meddőségi kezelésben részt vevő pár egyik tagjánál sem találunk semmilyen szervi, immunológiai, genetikai problémát, látszólag minden rendben van, a gyermekáldás mégis várat magára. Ezeket az eseteket, amikor nyilvánvaló okot nem találunk a meddőség hátterében, ismeretlen eredetű meddőségnek nevezzük. A meddőségi kezelésben részt vevő párok közel 30%-a küzd ezzel a problémával [1]. Az utóbbi néhány év kutatásai egy-

re inkább arra utalnak, hogy ezekben az esetekben a teljesen normális spermiumszám, -mozgás és -morfológia ellenére azok DNS-állománya akár nagyfokú töredezettséget, fragmentációt mutathat [2, 3]. A DNS-molekulát számos sérülés érheti még akár természetes körülmények között is. Ez lehet

- egy egyszerű pontmutáció;
- egy-egy génszakasz kiesése, azaz deléción;
- egy-egy szakasz beépülése, azaz addíción;
- deamináció következtében kialakuló léziók; illetve
- a bázisok oxidatív károsodása.

A kromoszómákba rendeződött örökítőanyag esetében is beszélhetünk hasonló jelenségekről:

Erkezett: 2021. május 10. Közlésre elfogadva: 2021. június 9. Received: 10 May 2021. Accepted: 9 June 2021

Levelezési cím: Dr. Máté Gábor, Pannon Reprodukciós Intézet, 8300 Tapolca, Bartók Béla u. 1–3.,
E-mail: mate.gabor@pri.hu

- deléciókról;
- egy-egy szakasz duplikációjáról;
- egy-egy szakasz megfordulásáról, azaz inverzióról; illetve
- egy-egy szakasz át is helyeződhet, ekkor transzlokációról beszélhetünk.

Ha a DNS-molekula egyik vagy mindkét szálán törés keletkezik (vagy törések keletkeznek), akkor DNS-fragmentációról beszélhetünk.

Napjainkra számos olyan publikáció látott napvilágot, amelyben igazolták, hogy az emelkedett spermium-DNS-fragmentáció (SDF) negatívan befolyásolhatja az embrió fejlődését, annak minőségét, beágyazódását, illetve a terhesség kialakulását [4, 5]. Simon és munkatársai [4] metaanalízisükben 8068 IVF/ICSI-ciklus klinikai terhességi kimeneteleit hasonlították össze az SDF függvényében, és szignifikáns negatív korrelációt találtak a vizsgált paraméterek között.

Az SDF-vizsgálat hazánkban még egészen kezdeti fázisát éli, különösen a nőgyógyászok kollégák találkozhattak legkevésbé erre vonatkozó eredményekkel. Éppen ezért jelen kéziratunk célja, hogy rövid betekintést adjunk az SDF vizsgálatának indikációira. Különös figyelmet kívánunk szentelni a nőgyógyászok számára is „árulkodó” jelekre.

A DNS-fragmentáció kialakulása

Az ivarsejtek genetikai állományának sértetlensége elengedhetetlen a sikeres fogantatáshoz. Ha a spermiumok örökítőanyagát alkotó DNS-spirál egyik vagy mindkét szálán törések keletkeznek, akkor DNS-fragmentációról beszélünk. Az SDF kialakul természetes folyamatként is, a spermatogenezis alatt fellépő apoptózis során, ahol a sejtek nagy részénél teljesen végbemegy az apoptózis, azonban egy másik részénél nem teljes ez a folyamat, ami életképes, de fragmentált DNS-sel rendelkező spermiumokat eredményezhet. Az SDF kialakulhat még a spermatogenezis alatt végbemenő DNS-újraszerveződés alatt is, de különféle külső, belső faktorok hatására mértéke akár kórossá is válhat, ami a génekben kódolt információ hibás megnyilvánulásához vezethet [6]. Külső faktoroként tartják számon a genitáliák hosszú távú emelkedett hőexpozícióját, a drog- és alkoholfogyasztást, a dohányzást, a sugárzást, továbbá a már eddig is ismert, hereműködési zavart okozó körülményeket (pl. a herék traumája, nem kontrollált hormonbevitel stb.). A belső faktorokhoz pedig a túlsúly, a fertőzések (leukocytospermia), a cukorbetegség, a rák, az emelkedett életkor, a herevisszértágulat, hormonális működési zavarok sorolhatóak [7–18]. Mind a belső, mind pedig a külső faktorok meglétekor több esetben is igazolták, hogy a hatásmechanizmus hátterében a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) szintjének megemelkedése állhat, és/vagy az őket kordában tartó antioxidáns enzimek csökkent expressziója. A ROS-szint tartós, kontrollálatlan megemelkedése számos patológias folyamatot indukálhat, mivel az élő sejtek csaknem minden összetevőjével képesek reakcióba lépni (fehérjék, szénhidrátok, lipidek, örökítőanyag). Szintjük csökken-

tése a kiváltó ok megszüntetésével, vagy pedig valamilyen semlegesítő antioxidáns molekula külső bejuttatásával az SDF-érték redukálásának egyik sikerrel alkalmazott terápiás módszere.

Vegyük sorra, hogy mik azok az indikációk, amelyek alapján a nőgyógyászok kollégák is gyanakodhatnak potenciálisan emelkedett SDF-értékre, és javasolhatják a férfi partner ez irányú kivizsgálását:

- Ismeretlen eredetű meddőség: a meddőségi kezelésben részt vevő párok mintegy 30%-át diagnosztizálják ismeretlen eredetű meddőséggel. Az SDF-vizsgálatoknak köszönhetően fény derült arra, hogy ezekben az esetekben a férfiak 30%-ának ondómintájában mérhető magas SDF-érték normozoospermia mellett [19, 20].
- Többszöri sikertelen IVF/ICSI-beavatkozás: az SDF-index emelkedésével párhuzamosan csökkenést figyeltek meg az embriók fejlődésében, implantációs rátájában, ebből kifolyólag a terhességi arányokban [4, 5, 21, 22].
- Habitualis vetélés: amikor vetelésről van szó, akkor legtöbbször alapvetően a hölgyekre koncentrálnunk, és keressük, hogy lehet-e valamilyen genetikai, immunológiai probléma a vetélés hátterében. Mindazonáltal több kutatásban is találtak összefüggést a többszöri vetélés és a magas SDF-index között [5, 23–25]. Jayasena és munkatársai munkájában [26] a kontrollcsoporthoz viszonyítva kétszer magasabb SDF-értéket mértek a habitualis vetéléssel küzdő pároknál. Nagyon fontos lenne, ha metaanalízisek készülnének a témában, mert olyan munkák is napvilágot láttak, amelyekben semmilyen kapcsolatot nem találtak a vetélés és az SDF-érték között [27].

A spermiumok DNS-fragmentációjának meghatározása

A felállított indikációk alapján négy lehetőség közül választhatunk (több is van, de ez a négy a legelterjedtebb) az SDF meghatározásához:

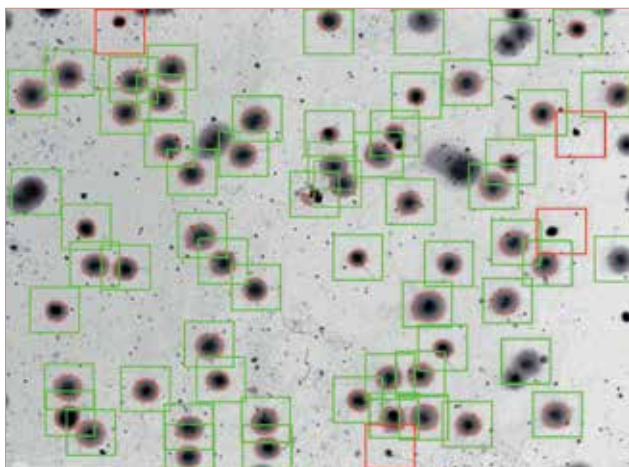
- terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay;
- comet assay;
- sperm chromatin structure assay (SCSA) és
- sperm chromatin dispersion (SCD) teszt.

Az egyes módszerek közti legnagyobb különbség, hogy míg a TUNEL assay és a comet assay direkt módon vizsgálja a DNS-törések meglétét; addig az SCSA és az SCD módszerek indirekt módon, a DNS savas denaturációra való érzékenysége alapján. Továbbá annak megállapítására, hogy a törések a DNS egyik vagy mindkét szálát érintik, a comet assay a legalkalmasabb módszer. A TUNEL assay és az SCSA assay leginkább az egyszálú DNS-törésekre érzékenyek, az SCD-teszt és a comet assay pedig az egy- és kétszálú törésekre [28]. Intézetünkben az SCD-technika alapján történik az SDF meghatározása. Magyarországon elsőként sikerült beszerezniünk egy SCA Scope spermiumanalizáló rendszert (Microptic, Spanyolország). Az

SCD-módszer a spermiumok kromatinállományának szétesztési, diszpergálódási képességét vizsgálja savas denaturációt és a nukleáris fehérjék eltávolítását követően. A spermiumok kromatinállománya hurkokban (loop) szerveződik. Intakt DNS-állomány esetén ezek a hurkok szét fognak terjedni, és kiterjedt „halót” képeznek (1. ábra). Amennyiben DNS-fragmentáció tapasztalható, akkor ez a fajta szétterjedés nem fog megtörténni, így a haloképződés elmarad, vagy csak minimális lesz [29]. A módszer előnye, hogy a vizsgálat akár egyszerű fénymikroszkóp segítségével is elvégezhető, nem igényel pluszban több tízmillió forintos berendezéseket, illetve másik nagy előnye, hogy az általunk is használt készülék az SDF vizsgálatán túl alkalmas a több spermiumparaméter vizsgálatára is (pH, koncentráció, motilitás, vitalitás, morfológia, leukocytospermia meghatározása). Hátránya a több esetben is hosszadalmas mintaelőkészítés, illetve a savas denaturáció használata. Ez utóbbi egyrészt azért jelent problémát, mert a módszer nem direkt méri az SDF-et, hanem a denaturációra való érzékenység alapján. Másrészt a denaturáció során alkalmazott oldatok közül több is potenciálisan toxikus, ami miatt fokozott odafigyelés és optimális esetben vegyi elszívófülke használata javasolt, bár hasonló „ellenérvek” a többi SDF-vizsgálati módszernél is elmondhatóak [28]. Utolsósorban pedig nagy lehet a vizsgálatokat végző technikusok közötti különbség. Ez két részből tevődik össze:

- mivel a minta-előkészítési protokoll hosszadalmas, több lépésből tevődik össze, hibalehetőséget jelenthet az egyes technikusok között;
- illetve a kiértékelés vizuálisan történik, emiatt még az automatizált rendszer is utólagos validálást kíván a lehetséges tévesztések miatt, ami a humán munkaerő miatt fokozottan érvényesülhet.

A fentieket leszámítva az SCD-módszeren alapuló protokollok talán leginkább standardizáltak, leginkább spermiumok vizsgálatára szabottak, több gyártó is forgalmaz azonnal használható kiteket.



1. ábra: A spermium-DNS-fragmentáció vizsgálata az SCD-módszer alapján. Zöld négyzetben a kiterjedt „halóval” rendelkező egészséges spermiumok láthatóak, míg piros négyzetben a „halót” nem, vagy csak minimálisan mutató, fragmentált DNS-sel rendelkező sejtek láthatóak

Javaslatok magas spermium-DNS-fragmentációs index esetére

Az általunk használt SCD-módszer esetén a gyártó által közzétett határérték, amely felett magas SDF-indexről beszélhetünk, 30% [29]. Érdemes megemlíteni, hogy jelenleg nincs egységes konszenzus az egyes határértékek tekintetében, ami annak köszönhető, hogy nincs egységes protokoll a minta-előkészítésekhez, illetve több vizsgálati módszer is rendelkezésünkre áll, amelyek más-más elven mérnek (direkt vs. indirekt, egyszálú DNS-törések vs. kétszálú DNS-törések) [28]. Magas SDF esetén kétféle módon járhatunk el:

- Andrológus kolléga irányításával terápiás javaslat kidolgozása, ha lehetséges. Ez lehet életmódváltás (fogyás, alkohol- és/vagy dohányzásabstíncencia), antioxidáns-terápia (ha bizonyítottan emelkedett ROS-koncentrációval társul az SDF), fennálló fertőzés antimikrobiális ágenssel való kezelése, herevisszér-tágulat kezelése [7, 9–13, 16].
- Ha nem lehetséges terápiás javaslat kidolgozása, akkor szakirodalmi adatok alapján az SDF-index csökkenthető spermiumszeparálási eljárásokkal. Intézetünkben kétféle szelekciós eljárást alkalmazunk, amelyek a mágneses spermiumszeparálás (MACS, Miltenyi Biotec, Németország) és a mikrofluiditáson alapuló spermiumszeparálás (ZyMot 850, ZyMot Fertility, USA). Ezeket a szeparálási módszereket csak röviden említjük, mivel a folyóirat egy korábbi lapszámában már részletesen tárgyaltuk őket [30].

MACS (magnetic-activated cell sorting)

A MACS-szeparálás elve, hogy az eukarióta sejtek apoptosisa során a plazmamembrán foszfátidil-szerinje a belső oldalról átfordul a külső oldalra, aminek köszönhetően hozzáférhetővé válik extracelluláris jelölők számára, amelyet esetünkben annexin V-nek hívnak. Ha az annexin V-höz mágnesgyöngyöket kapcsolnak, akkor – mágneses téren átfolyatva a mintát – az apoptotikus sejtek eliminálhatóak. Mivel az apoptosisa folyamata az aktiválódó endonukleázok miatt DNS-fragmentációval jár, az apoptotikus sejtek eliminálása csökkenti a spermiumminta SDF-indexét [31, 32].

Mikrofluiditáson alapuló spermiumszeparálás

A mikrofluidika a kis mennyiségű folyadék pontos kezelésének tudománya és technológiája, amelyet általában néhány száz mikrométeres méretű mikrocsatornában végeznek. Ennek a mérettartománynak két fő előnye van:

- az érintett áramlások laminárisak, lehetővé téve számunkra, hogy a folyadékok determinisztikus viselkedésének előnyeit kihasználva pontosan kezeljük a folyadékokat és a szuszpendált részecskéket, jelen esetben a spermiumokat (ez a tulajdonság a mi esetünkben kevésbé lényeges); illetve

- a csatornák orientációja és mérete miatt a csak a legmotilisabb spermiumok képesek áthaladni rajtuk. Mivel a spermiumok mozgékonyasága és SDF-indexe között szoros korrelációt véltek felfedezni, a technika alkalmas a minta SDF-értékének csökkentésére [9, 33, 34].

Mindezeket túl nem a szeparálás az egyetlen hatásos módszer az SDF csökkentésére. Habár az SDF meghatározása a natív ondómintából történik, és a természetes állapotot tükrözi, azonban meddőségi kezelés során alkalmazott IUI/IVF/ICSI mindegyikénél valamilyen előkészítésen esnek át a spermiumsejtek (sűrűséggradiens-centrifugálás, swim-up stb.). A szakirodalom szerint ezek mindegyike csökkenti a felhasznált minta SDF-indexét [35]. Mindezekből következik, hogy az emelkedett SDF elsősorban a természetes reprodukcióra gyakorol legnagyobb hatást, de ahogy azt már fentebb említettük Simon és munkatársai [4] metaanalízise kapcsán, az asszisztált reprodukcióban résztvevőknél is megfigyelhető ez a hatás mind IVF-, mind ICSI-ciklusokban. Ezenfelül ha betegeinkkel rövidebb absztinenciát tartatunk, akkor szintén javulás érhető el az SDF-értékben [36]. Biztató eredményeket értek el magas SDF-értéknél végzett műéti spermiumnyerés alkalmazásával. Ezekben az esetekben kiküszöbölhető, hogy a spermiumok transzportja és tárolása során bármiféle, DNS-re negatív hatás megnyilvánuljon. Magas SDF esetén TESE (testicular sperm extraction) használatával szignifikánsan magasabb terhességi eredményeket értek el több esetben is [37]. Végezetül a petesejtek rendelkeznek több természetes javítómechanizmussal (nukleotidexcíziós repair, bázisexcíziós repair, mismatch repair). Ha a törés(ek) a DNS kettős spiráljának csak az egyik szálát érintik, akkor a petesejtek azt könnyen javítani képesek, azonban ha mindkét szálát, akkor a javítás lehetősége sokkal limitáltabb, és pontosan a kettős szálú DNS-törések okoznak olyan mutációkat, kromoszómaátrendeződések, amelyek kihatnak az embriók fejlődésére, illetve a terhességi kimenetelekre, súlyos esetben pedig elindítják az apoptosist, a programozott sejthalált [36]. Egérkísérleteken kimutatták, hogy a petesejtek DNS-javító képessége az életkorral csökken, ami azt indukálja, hogy ezeknek a szeparációs technikáknak az idősebb pároknál lehet kiemelkedő haszna [38].

Következtetések

Az elmúlt néhány évben egyre nagyobb átalakuláson kezd átmenni a meddőségkezelés. Az eddig alkalmazott konvencionális technikák, legyen szó a spermiumok vizsgálatáról és feldolgozásáról, a petesejtek manipulációjáról vagy az embriók tenyésztéséről és szelekciójáról, úgy tűnik, elérték a határukat, amit a sikeresség terén nyújtani tudnak. Ahhoz, hogy előrébb tudjunk lépni, mélyebb betekintést kell nyernünk az ivarsejtek/embriók belső molekuláris történéseibe. Ennek egyik módszere a spermiumok DNS-állományának vizsgálata. Az ivarsejtek örökítőanyagának sértetlensége elengedhetetlen ahhoz, hogy genetikailag, kromoszómáisan egészséges euploid embriókat nyerjünk. Az eddigi gyakorlat rendszerint a petesejtek, majd a belőlük képződő emb-

riók anyai életkorral emelkedő aneuploidijára, kromoszóma-rendellenességeire koncentrált. Mindazonáltal be kell látnunk, hogy a zigóta genetikai állományának 50%-a a hímivarsejtből származik, ebből kifolyólag szükségessé váltak módszerek, amelyek a hímivarsejtek DNS-intaktságába engednek betekinteni. Magyarországon jelenleg olyannyira gyerekcipőben járnak az ilyen jellegű vizsgálatok, hogy nincs szakmailag elfogadott koncepció a spermium SDF-vizsgálatára, annak indikációira, sőt a WHO megjelenés előtti, hatodik kézikönyve is csak most fog foglalkozni a témával, az eddigiek ezt nem tették. Bár a szakirodalom adatai még nem teljesen egyértelműek, de úgy tűnik, hogy felállíthatók bizonyos indikációk, amelyek megléte mellett emelkedett SDF-re számíthatunk. Andrológiai indikációk:

- életviteli kockázati tényezők,
- emelkedett életkor,
- herevisszér-tágulat,
- fertőzések, magas ondo-ROS-érték, hormonzavarok (magas FSH, alacsony tesztoszteron, magas prolaktin),
- ismeretlen eredetű meddőség.

Nőgyógyászati indikációk:

- ismeretlen eredetű meddőség,
- habituális vetelés,
- többszöri sikertelen IVF/ICSI-beavatkozás.

Ez utóbbi három indikáció könnyen felismerhető minden nőgyógyász kollégája számára, és a kezelt pár andrológus kollégához irányítható. Fontos azonban megemlíteni, hogy a meddőségi programba való bekerüléskor, ha párhuzamosan, kellő alapossgal vizsgáljuk férfi és női betegeinket, akkor a probléma gyökerének korai feltárása sok esetben megkímélheti a párokat többszöri sikertelen kezeléstől vagy vetéléstől. Ha nem orvosolható valamilyen terápiával az SDF (pl. antioxidáns-terápia, életmódváltás, herevisszértágulat-helyreállítás, antibiotikumkúra stb.), akkor hazánkban elérhető már többféle spermiumszeparációs módszer is, amelyek az SDF-index csökkentésére lettek fejlesztve. Mindazonáltal ezeknek a szeparációs technikáknak a hasznossága sem teljesen bizonyított napjainkig. Például a rossz válaszképességű idősebb betegeinknél csodát nem várhatunk tőlük, de magas SDF-érték esetén potenciálisan hasznos eszközként szolgálhatnak. Mindeztől függetlenül a következő években mélyebb betekintést kell nyernünk az SDF és az infertilitás közötti kapcsolatba, valamint a szeparációs technikák potenciális SDF-csökkentő hatásaiba, illetve nagy szükség lenne arra, hogy további metaanalízisek készüljenek a témában, hogy megismerjük, mi is ezeknek a módszereknek a valódi haszna.

A szerzőknek nincsenek anyagi érdekeltségeik.

IRODALOM

1. Quaaas A, Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. Rev Obstet Gynecol 2008; 1: 69–76.
2. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, et al. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. J Assist Reprod Genet 2014; 31: 527–32.
3. Evgeni E, et al. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. J Reprod Infertil 2014; 15: 2–14.
4. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. Asian J Androl 2017; 19: 80–90.

5. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2019; 38: 951–960.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Oxford University Press, 2007.
7. Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E, et al. Undiagnosed prediabetes status is associated with a reduced effectiveness of phosphodiesterase type 5 inhibitors in men with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2020; 32: 393–400.
8. Kim GY. What should be done for men with sperm DNA fragmentation? *Clin Exp Reprod Med* 2018; 45: 101–109.
9. Komiya A, Kato T, Kawauchi Y, Watanabe A, Fuse H. Clinical factors associated with sperm DNA fragmentation in male patients with infertility. *Scientific World Journal* 2014; 2014: 868303.
10. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil Camb* 2010; 13: 189–93.
11. Zhang MH, Zhai LP, Fang ZY, Li AN, Qiu Y, Liu YX. Impact of a mild scrotal heating on sperm chromosomal abnormality, acrosin activity and seminal alpha-glucosidase in human fertile males. *Andrologia* 2018. doi: 10.1111/and.12985
12. Sheehan MM, Ramasamy R, Lamb DJ. Molecular mechanisms involved in varicocele-associated infertility. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31: 521–6.
13. Agarwal A, Sekhon LH. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified? *Indian J Urol* 2011; 27: 74–85.
14. O'Brien J, Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility: A review. *Urology* 2005; 65: 16–22.
15. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003; 80: 1431–6.
16. Jung JH, Kim MH, Kim J, et al. Treatment of leukocytospermia in male infertility: A Systematic Review. *World J Mens Health* 2016; 34: 165–172.
17. Lu R, Chen X, Yu W, et al. Analysis of age-associated alteration of SCSA sperm DNA fragmentation index and semen characteristics of 1790 subfertile males in China. *J Clin Lab Anal* 2020; 34: e23548.
18. Pino V, Sanz A, Valdés N, Crosby J, Mackenna A. The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA Assist Reprod* 2020; 24: 82–86.
19. Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, Giwercman A, Bungum M. Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology* 2013; 1: 357–60.
20. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 1597–605.
21. Bach PV, Schlegel PN. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic Clin Androl* 2016; 26: 15.
22. Benchaib M, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18: 1023–8.
23. Barih GM, Jacoby E, Binkley P, Chang TC, Schenken RS, Robinson RD. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of couples with unexplained recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Fertil Steril* 2016; 105: 329–36.
24. Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, Akbary A, Heydari ST. Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2014; 46: 126–30.
25. Kumar K, Deka D, Singh A, Mitra DK, Vanitha BR, Dada R. Predictive value of DNA integrity analysis in idiopathic recurrent pregnancy loss following spontaneous conception. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 861–7.
26. Jayasena CN, Radia UK, Figueiredo M, et al. Reduced testicular steroidogenesis and increased semen oxidative stress in male partners as novel markers of recurrent miscarriage. *Clin Chem* 2019; 65: 161–169.
27. Coughlan C, Clarke H, Cutting R, et al. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian J Androl* 2015; 17: 681–685.
28. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med* 2019; 46: 14–21.
29. Liffner S, et al. Diagnostics of DNA fragmentation in human spermatozoa: Are sperm chromatin structure analysis and sperm chromatin dispersion tests SCD-HaloSpermG2[®] comparable? *Andrologia* 2019; 51: e13316.
30. Máté G, Török A. Spermiumdiagnostikai és szelekciós eljárások. *Magy Nőorv L* 2020; 83: 271–275.
31. Aziz N, et al. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 2007; 22: 1413–1419.
32. de Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonnes D, et al. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 1.
33. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod* 2018; 33: 1388–1393.
34. Parrella A, Keating D, Cheung S, et al. A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *J Assist Reprod Genet* 2019; 10: 2057–2066.
35. Neena V, Murugan M. Effect of wash and swim-up and density gradient sperm preparation on sperm DNA fragmentation. *Mater Today-Proc* 2021; 45: 2002–2005.
36. Gunes S, Sertyel S. Sperm DNA damage and oocyte repair capability. *A Clin Guid to Sperm DNA Chromatin Damage* 2018; 321–346.
37. Esteves SC, Roque M, Garrido N. Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: a SWOT analysis. *Asian J Androl* 2018; 20: 1–8.
38. Horta F, Catt S, Ramachandran P, et al. Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Hum Reprod* 2020; 35: 529–544.