

Yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) sperm seçiminde kullanılan teknikler ve yenilikler

Bio. Mehmet Ali Tüfekçi¹, Prof. Dr. M. Murad Başar²

¹İstanbul Memorial Hastanesi, IVF-Genetik Bölümü, Androloji Laboratuvarı;

²İstanbul Memorial Hastanesi, Üroloji/Androloji Bölümü

Cinsel ilişki sonrası doğal bariyerler ve eliminasyonlar nedeniyle spermlerin sadece %10'u kadın genital sisteminde servikse ulaşırken; %1'i uterusu ; %0.1'i ise Fallop tüplerine kadar gelebilmektedir. Spermatozoanın kadın genital sisteminde ilerleyişi sonrası 100-1000 adet spermatozoa kumulus ooforus kompleksine ulaşmakta ve sonuçta sadece 1 adet spermatozoa oosit ile etkileşime girerek fertilizasyonu sağlamaktadır (1).

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) sırasında kullanılacak spermatozoanın son aşamaya kadar ulaşmış hiperkatif, normal morfolojide, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu yapabilecek normal DNA yapısında spermatozoa olması gereklidir. İlk tüp bebek denemesinden sonra zaman içerisinde klinik ve embriyoloji alanındaki bilgi birikiminin hızlı artışı yeni teknolojilerin gelişimini beraberinde getirmiştir. 1990'lı yıllara ulaşıldığında klasik in vitro fertilizasyon yönteminden sonra intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun (ICSI) keşfi ile tüp bebek alanında yeni bir çağa girilmiştir (2, 3). ICSI yöntemi erkek infertilitesi yaşayan çiftlerin bebek sahibi olabilmelerinin yolunu açmıştır. ICSI yönteminin yaygınlaşması ve her geçen gün artan sayıda IVF merkezi tarafından kullanılması ile birlikte artan bilgiler, özellikle erkek gamet seçiminin önemli olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (4, 5). Bu noktadan yola çıkarak geleneksel sperm hazırlama yöntemleri yakın incelemeye alınarak, elde edilen sperm kalitesi anlamında semen parametreleri ve geri kazanım oranları gibi sonuçların araştırılmasına yol açmıştır (6, 7).

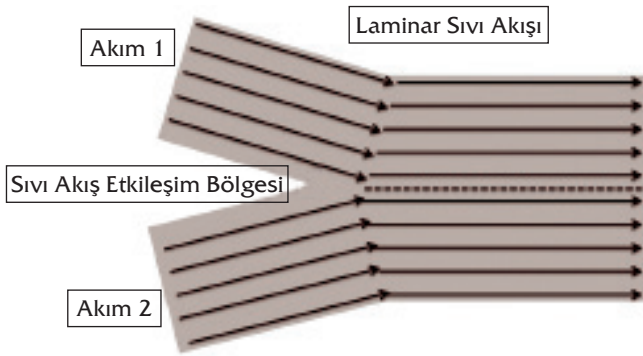
YÜT'de kullanılacak spermatozoanın eldesi için günümüzde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemleri başlıca üç gruba ayırarak değerlendirebiliriz: 1) Sofistike yöntemler ve morfolojik değerlendirmeler; 2) Elektriksel yüke bağlı olarak sperm seçim teknikleri ve 3) Moleküler bağlanma mekanizmaları ile sperm seçimi.

Sofistike yöntemler ve morfolojik değerlendirmeler ile spermatozoa seçimi

Sperm hazırlığı ve izolasyonunda motil sperm eldesinin artırılması ve aynı zamanda DNA hasarının azaltılmasının döllenme oranı ve embriyo gelişiminde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (8, 9, 10). Bu nedenle sperm hazırlığında motil sperm elde ederken aynı zamanda daha az DNA hasarına sebep olacak yöntemlerin geliştirilmesi YÜT'de önem taşımaktadır.

Motilite, sperm kalitesinin değerlendirilmesi açısından en önemli parametrelerin başında gösterilmektedir. Bu nedenle güvenli ve etkili bir şekilde motil sperm eldesi sağlayacak yöntemler tercih edilmektedir. Bu metodlar arasında geleneksel yöntemlerden swim-up ve yoğunluk gradient metodu sayılabilir (11, 12). Bu sperm hazırlama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin; yoğunluk gradient metodunda işlemlerin santirifüj ile yapılması sebebiyle reaktif oksijen türevlerinin artışı ve bu nedenle DNA bozulmaları meydana geldiği bilinmektedir (13, 14). Swim-up yönteminde ise elde edilen motil sperm sayılarında değişkenlikler gözlenmektedir (11, 15, 16).

Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi: Normal spermatozoa morfolojik değerlendirmesi fiksasyon sonrası özel boyalar ile hazırlanan preparatta ve x1000 büyütme altında yapılır. Ancak, ICSI işleminde taze preparatta x400 büyütmede en normal görünümlü spermatozoalar seçilerek kullanılmaktadır. YÜT başarısı kullanılan spermin morfolojisi, fonksiyonu ve genetik yapısı ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle ışık mikroskobu altında yapılan değerlendirme spermin fonksiyonel özellikleri yanı sıra DNA hasarı hakkında da yeterli bilgi vermez. Ryu ve ark. yaptıkları bir çalışmada sperm morfolojisi ile



Şekil 1. Laminar sıvı akış düzeninin şematik gösterimi. (Suh ve ark 2003'den modifiye edilerek (54)).

genetik anomaliler arasında bağlantı olduğunu, özellikle anöploidik olgularda daha sık olduğunu ifade etmişlerdir (17). Bu durum YÜT'de sperm seçiminde farklı morfolojik değerlendirme yöntemlerinin araştırılmasına yol açmıştır. İlk defa Bartoov tarafından tanımlanan Motil Sperm Morfolojik Değerlendirilmesi (MSOME) olarak ifade edilen x6300-7000 büyütme altında Nomarski interferans mikroskopu kullanılarak sperm yapısal özelliklerinin değerlendirildiği görüntüleme yöntemi tanımlanmıştır (18). Bu yöntem ile spermatozoanın altı bölgesinde yapısal özellikler incelenir (i) Akrozomal bölge; ii) Post-akrozomal bölge, iii) Boyun, iv) Mitokondri, v) Flajella ve vi) Sperm kuyruğu). Ardından, baş bölgesinde vakuol varlığı ve vakuol yüzey alanı hesaplanır (19).

MSOME ve ICSI'nin birlikte kullanıldığı yöntem IMSI olarak adlandırılır (20). Yapılan çalışmalar IMSI ile fertilizasyon, blastosist gelişimi, implantasyon ve gebelik oranlarında artış olduğunu göstermiştir (21-24). Ancak, son yıllarda yapılan bir meta-analizde IMSI'nin sadece seçilmiş olgularda uygulanması gereken bir yöntem olduğu ifade edilmektedir. Şiddetli sperm morfolojik bozukluğu, sperm DNA hasarı varlığı ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan olgularda IMSI ile daha başarılı sonuçlar elde edildiği belirtilmektedir (25, 26).

Mikrofluidik Sistemler: Mikrofluidik son yıllarda hızla gelişim gösteren ve moleküler biyoloji, kimya ve tıp alanlarında kullanımı umut vaat eden yeni bir tekniktir (27-29). Yöntemin temeli bir mikroçevre ortamında sıvıların hareketinin fizik prensiplerine dayanmaktadır.

Sıvıların mikrokanallar içerisindeki hareketi, hareket eden sıvının viskozitesi, dansitesi ve velositesi ile kanalın geometri ve boyutlarına bağlı olarak türbülans ya da laminar hareket şeklindedir. Gerekli şartlar sağlanarak kanal

içerisindeki sıvı akışı kanal içerisinde iki ya da daha fazla sayıda sıvı katmanının tek yönlü ve tahmin edilebilir laminar akımı sağlanabilir (Şekil 1). Bu akış sırasında sıvı tabakaları arasında difüzyon kuvveti ile çeşitli molekül ya da yapıların geometrik özellikleri, hareketleri, elektrik yükleri gibi farklı özelliklerinden faydalanılarak ayrıştırılıp ayrı kaynaklarda toplanması sağlanabilir.

Günümüze kadar androloji alanında kullanılmak üzere çeşitli mikrofluidik sistemler geliştirilmiştir. Ancak, ilk defa Kricka ve ark. mikrofluidik bir sistemle motil sperm bir semen örneğinden ayrıştırılabileceğini göstermişlerdir (30). Cho ve ark. paralel-laminar akımlı mikrofluidik sistem kullanarak hareketli sperm düşük kaliteli ve hareket-sizlerden ayrıştırmayı başarmıştır (31). Takip eden yıllarda 3 kanallı mikrofluidik sistemde kimyasal gradient oluşturularak sperm kemotaksi ile ayrıştırılabilmektedir (32, 33). Aynı dönemde Segerink ve ark. elektrik empedans özelliği ile sperm hücrelerini round spermatid, lökosit ve diğer elemanlardan ayırt edebilen bir sistemi mikrofluidik kanala adapte ederek sperm konsantrasyonu ve hareketli sperm yüzdesinin hesaplanmasını yapabilen entegre bir sistem oluşturmuşlardır (34, 35).

Mikrofluidiklerin pek çok avantajları olmasına rağmen en büyük dezavantajı olarak semen yükleme kapasitesinin mikrolitre seviyelerinde düşük oluşu sayılabilir. Reza ve ark. 1 mililitre seviyesinde bazal semen ile çalışılmasına olanak tanıyan sistem geliştirerek kapasite sorununun çözümünde önemli bir gelişme sağlanmıştır (36).

Elektriksel yüke göre sperm seçimi

Epididimal matürasyon sırasında spermatozoanın normal morfolojisi yanı sıra kapasitasyon düzeyini de etkileyen çeşitli negatif yüklü çeşitli sekretuar proteinlerin bulunduğu bilinmektedir (1). Spermatozoanın sahip olduğu elektriksel yük aracılığı ile çeşitli sperm seçim yöntemleri geliştirilmiştir.

Zeta potansiyel: Sperm membranının elektriksel yükü -16mV'dan -120 mV'a kadar değişmektedir ve "elektrokinetik potansiyel" veya "zeta potansiyel" olarak adlandırılır (37, 38). Membran potansiyelinden farklı olarak "zeta potansiyeli" süspansiyonda ara yüzden uzaklaşan hareketli sperm hücrelerinin düzlemdeki elektriksel potansiyelini ifade eder. Kültür medyumunu serum veya albümin içermediği zaman spermatozoa negatif yükleri dolayısıyla cam yüzeye yapışırlar. Bu yöntem ile süspansiyonda şarj edilmiş

sperm hücreleri elde edilebilir. Bu spermatozoanın normal DNA bütünlüğü, normal morfoloji ve normal kromatin yoğunluğuna sahip olduğu ve hiperaktivasyona geçme yeteneği açısından daha iyi olduğu kabul edilmektedir (38, 39). Bu yöntemin kriyoprezervasyon sonrası akrozom ve DNA yapısı sağlam sperm seçiminde kullanılabilmesi belirlenmiş ve ICSI ile fertilizasyon oranları artmıştır (40).

Düşük maliyeti nedeniyle sperm seçiminde kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, X kromozom taşıyan spermeler daha negatif yüklü oldukları için bunların seçiminde taraflı olunabilir. Ayrıca, sekreter proteinlerin hızla azalması etkileri kaybolduğu için hazırlık sonrası yöntemin vakit kaybetmeden uygulanması gereklidir (1, 38).

Elektroforez: Matür sperm hücrelerini mikro akım teknikleri kullanılarak immatür hücreler, disfonksiyonel germ hücreleri ve lökositlerden ayırmak için geliştirmiş bir yöntemdir (41). Mikrofluidik sistemlere benzeyen bu yöntemde elektriksel yük ile akışkanlık sağlanmaktadır. Bu yöntemle fonksiyonel sperm hücresi uygun çaptaki deliklerden geçebilmekte; böylece fonksiyonel, morfolojik ve genetik olarak normal spermatozoa elde edilebilmektedir (42).

Yapılan çalışmalar elektroforetik olarak seçilmiş spermelerin oksidatif strese uzak olduğunu ve zona bağlanma kapasitelerinin normal olduğunu ortaya koymuştur (43). Ancak, bu yöntem pahalı ekipman ve deneyim gerektiren bir uygulamadır.

Moleküler bağlanma yöntemleri

Sperm yüzeyindeki moleküller epididimal matürasyon ve normal sperm fonksiyonu için önemli yapılarıdır. Ayrıca, bu yapılar oosit dölleyebilecek sperm saptanması için kullanılabilir. Bu amaçla ilişkili iki madde tanımlanmıştır: Anexin V ve Hyaluronik asit.

Kaynaklar

1. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl.* 2012 Mar;14(2):260-9.
2. Palermo G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992; 340, 17-18.
3. Palermo G., Camus M., Joris, H. et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 1993; 59, 826-835.
4. Westergaard HB., Tranberg Johansen AM., Erb K. and Nyboe Andersen A. Danish National In-Vitro Fertilization Registry 1994 and 1995: a controlled study of births, malformations and cytogenetic findings. *Hum. Reprod.* 1999; 14, 1896-1902.
5. Liu DY., Baker HWG. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI *Asian J Androl* 2002 Dec; 4: 281-285.

Anexin V: Canlı hücre plazma membranı iç yüzünde negatif yüklü fosfolipid serine (PS) bağlanan 35 kD ağırlığında bir proteindir. Apoptozis erken bulgusu olarak PS iç tabakadan dış tabakaya çıkar. Ayrıca, PS'in sperm dış yüzüne doğru yer değiştirmesi DNA hasarı ile de ilişkilidir (44, 45). Bu bulgular dikkate alınarak YÜT'de dış membranda Anexin V içermeyen spermatozoaların seçimi (non-apoptotik/Annexin V negatif sperm) tanımlanmıştır

Hyaluronik Asit (HA): Benzer şekilde olgun sperm hücreleri yüzeyinde HA reseptörleri vardır ve bu durum sperm motilitesi ve akrozom reaksiyonu ile ilişkilidir (46, 47). Hyaluran bağlı spermatozoa düşük DNA hasarı ve düşük kromozomal anöploidi içermektedir (48, 49). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda HA bağlı spermelerle elde edilen fertilizasyon, implantasyon ve gebelik oranları HA bağlı olmayanlar ile yapılanlardan farklı bulunmamıştır (50).

Gelişmekte olan yöntemler

Uygulanmakta olan tüm tekniklere rağmen halen daha uygun sperm seçimine yönelik incelemeler devam etmektedir. Bu amaçla "Raman Mikrospektrometresi" ile spermatozoa DNA yapısının değerlendirilmesi; "Konfokal+Spektroskopik Mikroskop" ile spermatozoanın hücresel düzeyde incelenmesi ve "Polarizasyon Mikroskop" ile spermatozoanın nükleer yapısının ortaya konulmasına yönelik araştırmalar henüz deneysel olarak devam etmektedir (51, 52, 53).

Sonuç olarak, YÜT'de sperm eldesi için geleneksel sperm hazırlama yöntemlerinde ortaya çıkan sperm kayıpları ve DNA hasarının önüne geçebilecek, ayrıca var olan sperm DNA hasarını ortaya koyarak sağlıklı ve fertilizasyon şansı yüksek sperm seçimine yönelik hızlı teknikleri geliştirmek amacıyla araştırmalar devam etmektedir.

6. Henkel RR., Schill WB. Sperm Preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 14, 108-129.
7. Boomsma CM., Heineman MJ., Cohlen BJ., Farquhar C. Semen Preparation Techniques for Intrauterine Insemination. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007, 4.
8. Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1991; 6:173-6.
9. Donnelly ET., O'Connell M., McClure N., Lewis SE. M. Differences in Nuclear DNA Fragmentation and Mitochondrial Integrity of Semen and Prepared Human Spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2000, 15, 1552-1561.
10. Marchetti C., Obert G., Deffosez A., Formstecher P., Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod.* 2002; 17, 1257-1265.
11. Englert Y., Vandenbergh M., Rodesch C., Bertrand E., Biramane J., Legreve

- A. Comparative auto-controlled study between swim-up and percoll preparation of fresh semen samples for invitro fertilization. *Hum. Reprod.* 1992; 7, 399-402.
12. Trounson, AO. and Gardner, DK. (2000) *Handbook of In Vitro Fertilization*, 2nd edn. CRC Press LLC, Boca Raton
 13. Aitken RJ., Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 1988; 9, 367-376.
 14. Zini A., Finelli A., Phang D., Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm dna integrity. *Urology* 2000, 56, 1081-1084.
 15. Smith S., Hosid S., Scott L. Use of postseparation sperm parameters to determine the method of choice for sperm preparation for assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* 1995; 63, 591-597.
 16. Ricci G., Peticarari S., Boscolo R., Montico M., Guaschino S., Presani G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil. Steril.* 2009, 91, 632-638.
 17. Ryu HM., William W Lin, Dolores J Lamb, Weber Chuang, Larry I Lipshultz, Farideh Z Bischoff. Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology: implication for intracytoplasmic sperm injection., *ertility and Sterility*, 2001; Volume 76, Issue 5, Pages 879-883,
 18. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002 Jan-Feb;23(1):1-8.
 19. Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL, Franco JG Jr. Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. *Reprod Biomed Online.* 2009 Mar;18(3):320-6.
 20. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril.* 2003 Dec; 80(6):1413-9.
 21. Vanderzwalmen P, Bach M, Neyer T, Stecher A, Zintz M, Zech N. Blastocyst formation after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) according to the morphological integrity of human sperm nuclei. *RBMonline* November 2008
 22. Setti SA, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cássia Sávio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: A meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2010 Oct; 21(4):450-5.
 23. Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, et al. Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 150:42-6.
 24. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Mar; 28(3):253-62.
 25. Setti AS, Paes de Almeida Ferreira Braga D, Iaconelli A Jr, Aoki T, Borges E Jr. Twelve years of MSOME and IMSI: a review. *Reprod Biomed Online.* 2013 Oct; 27(4):338-52.
 26. Perdrix A, Rives N. Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) and sperm head vacuoles: state of the art in 2013. *Hum Reprod Update.* 2013 Sep-Oct; 19(5):527-41.
 27. Weigl BH., Yager P. Microfluidics: microfluidic diffusion-based separation and detection. *Science.* 1999; 283, 346-347.
 28. Takayama S., Ostuni E., LeDuc P., Naruse K., Ingber D. E., Whitesides G. M. Laminar Flows: Subcellular Positioning of Small Molecules. *Nature* 2001, 411, 1016-1016.
 29. Hao HC., Tang KT., Yang CM., Chao JS., Li CH., Ku PS., Yao DJ. A portable electronic nose based on bio-chemical surface acoustic wave (saw) array with multiplexed oscillator and readout electronics. *Sensors Actuators B Chem.* 2010; 146, 545-553.
 30. Kricka, LJ., et al., Applications of a microfabricated device for evaluating sperm function. *Clinical Chemistry*, 1993; 39(9): p. 1944-1947
 31. Cho BS., Schuster TG., Zhu XY., Chang D., Smith GD., Takayama S. Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Anal. Chem.* 2003; 75, 1671-1675.
 32. Koyama S, Amarie D, Soini HA, Novotny MV, Jacobson SC. Chemotaxis assays of mouse sperm on microfluidic devices. *Anal Chem* 2006;78: 3354-9
 33. Xie L, Ma R, Han C, Su K, Zhang Q, Qiu T, Wang L, Huang G, Qiao J, Wang J, Cheng J. Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a microchannel-based device. *Clin Chem.* 2010 Aug; 56(8):1270-8
 34. Segerink, LL., et al., On-chip determination of spermatozoa concentration using electrical impedance measurements. *Lab on a Chip*, 2010; 10: 1018-1024.
 35. Segerink, LL., et al., A Lab-on-a-chip technology for clinical diagnostics: the fertility chip. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*, 2012; 37: 61-63.
 36. Reza Nosrati, Marion Vollmer, Lise Eamer, Krista Zeidan, Maria C. San Gabriel, Armand Zini, David Sinton. Microfluidic separation of motile sperm with millilitre-scale sample capacity. *The DFD12 Meeting of The American Physical Society* 2012.
 37. Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl.* 1991 Oct; 14(5): 340-7
 38. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril.* 2006 Feb; 85(2): 481-6.
 39. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalae M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia.* 2009; 42:13-9.
 40. Kam TL, Jacobson JD, Patton WC, Corselli JU, Chan PJ. Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. *J Assist Reprod Genet.* 2007 Sep; 24(9): 429-34.
 41. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005 Aug; 20(8): 2261-70.
 42. Ainsworth C, Nixon B, Jansen RP, Aitken RJ. First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. *Hum Reprod.* 2007 Jan; 22(1): 197-200.
 43. Aitken RJ, Hanson AR, Kuczera L. Electrophoretic sperm isolation: optimization of electrophoresis conditions and impact on oxidative stress. *Hum Reprod.* 2011 Aug; 26(8): 1955-64.
 44. van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost.* 1995 Feb; 73(2): 172-9.
 45. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995 Jul 17; 184(1): 39-51.
 46. Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril.* 1990 Dec; 54(6): 1127-34
 47. Slotte H, Akerlöf E, Pousette A. Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid induces, and Percoll inhibits, the acrosome reaction. *Int J Androl.* 1993 Dec; 16(6): 349-54.
 48. 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. *Fertil Steril.* 2005 Dec; 84(6): 1665-73.
 49. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae MEvaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2008 May; 25(5): 197-203.
 50. Parmegiani L, Cognigni GE, Filicori M. Risks in injecting hyaluronic acid non-bound spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2010 Mar; 20(3): 437-8
 51. Huser T, Orme CA, Hollars CW, Corzett MH, Balhorn R. Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells. *J Biophotonics.* 2009 May; 2(5): 322-32.
 52. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2010 Feb; 93(3): 807-13
 53. Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004 Jul-Oct; 36(3-4): 333-9.
 54. Suh RS., Phadke N., Ohl D.A., Takayama S., and Smith GD.: Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics. *Human Reproduction Update*, 2003; 9(5), 451-461.