

Kaliteli spermin seçiminde güncel yöntemler

Dr. Sibel Bulgurcuoğlu Kuran, Uzm. Bio. Ayşe Altun
İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, ÜYTE Merkezi

İnfertilite tedavisinde, yardımla üreme teknikleri yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, canlı doğum oranları hala istenilen seviyede değildir (1). Daha önceleri, gelişimin ilk evrelerinde oositin protein ve RNA sentezini gerçekleştirdiği, spermin ise sadece babadaki genlerin embriyoya taşınmasında rol oynadığı düşünülüyordu. Günümüzde ise spermin bir çok önemli rolünün olduğu, fertilizasyonun erken aşamaları, implantasyon ve daha ileri yaşam evrelerinde de etkilerinin olduğu gösterilmiştir (2,3).

Yardımla üreme tedavilerinde başarının sağlanması kaliteli gametlerin seçilmesi ile mümkün olmaktadır. İyi kaliteli spermin seçiminde, hala klasik yöntemler kullanıldığı gibi geliştirilmiş olan ve hatta geliştirilen yeni yöntemler de mevcuttur. Rutin sperm hazırlama tekniklerinden olan dansite gradyent santrifügasyon (DGS) ve yüzdürme yöntemleri (swim-up) hali hazırda yardımla üreme işlemlerinin temel bileşenleridir. Bu yöntemlerde sperm, sedimentasyon yada migrasyon temeline dayanarak ayrıştırılırlar (4). Bu yöntemlerle spermin motilite ve morfoloji özelliklerine göre seçim yapılmaktadır (5). Bununla birlikte rutin hazırlık yöntemleri ile spermin DNA bütünlüğü, membran maturasyonu, apoptotik özellikleri, ultra yapısı gibi özellikleri tespit edilememektedir. İnfertilite tedavisi sırasında bu özelliklerin belirlenerek sperm seçiminin gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu noktadan yola çıkılarak, yeni sperm seçim yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

İnfertil çiftlerin tedavisinde gelişmiş sperm seçim yöntemlerinin kullanılmasına yoğun olarak ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle ağır erkek faktörü hastalarının tedavisi için ICSI yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat DNA hasarlı sperm kullanıldığında sadece fertilizasyon değil, embriyo gelişimi, implantasyon ve gebelik oranları düşmekte, düşük oranları artmakta ve doğan bebeklerde ciddi sorunlar gözlemlenmektedir (6–9).

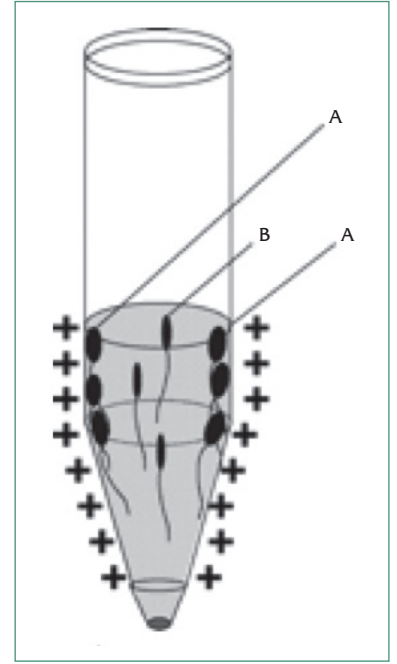
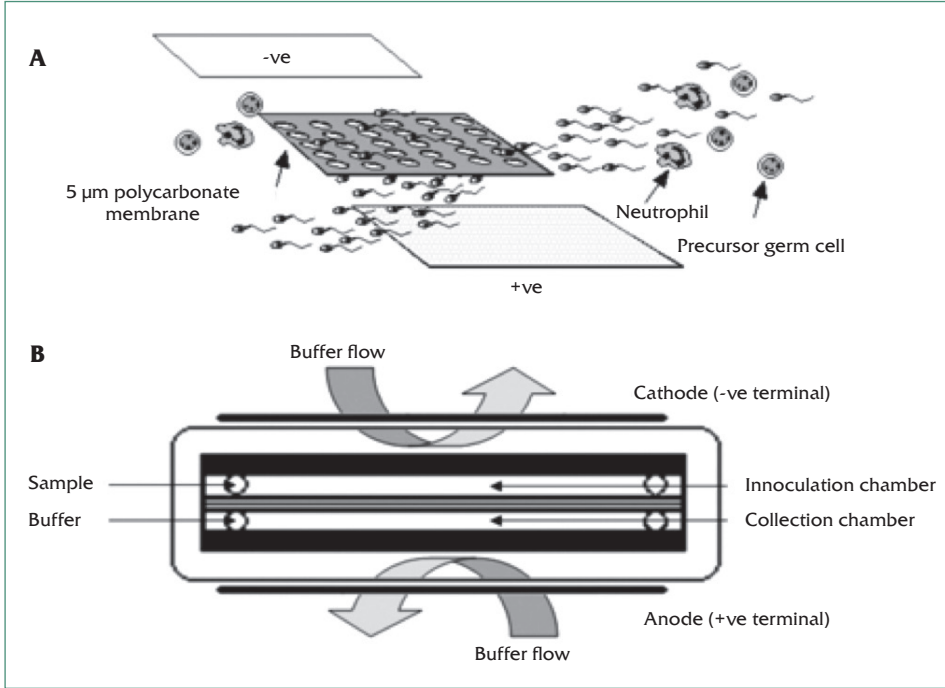
Geliştirilen yeni seçim yöntemleri kısaca aşağıda özetlenmeye çalışılmıştır:

1 - Sperm yüzey yüküne göre seçim

Elektroforez temeline dayanan bir teknolojidir. Sperm-lerin taşıdıkları elektronegatif yüke ve büyüklüğüne göre ayrılma gerçekleşmektedir (Microflow CS-10, Nusep Ltd., Frenchs Forest, Australia). Bir elektronegatif yüzey yükü spermin normal olarak farklılaştığını göstermektedir. Farklılaşmış sperm yüzeyinin CD52 antijenine sahip olması gerekmektedir (10). CD52 ekspresyonunun, normal sperm morfolojisi ve kapasitasyonu ile doğru orantılı olduğu tesbit edilmiştir. Elektroforetik yöntem ile spermin kalitesinin yüksek olduğu, aynı zamanda lökosit ve germ hücreleri uzaklaştırıldığından izole bir şekilde sperm elde edilebildiği öne sürülmektedir (11).

Sperm seçiminde kullanılan elektroforetik yöntemler hızlıdır ve kısa sürmektedir (2). Santrifüj basamağı bulunmadığından, sonrasında reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşması ve bu ürünlerin olumsuz etkileri gözlenmemektedir (12). Aynı zamanda lökosit ve immatur germ hücreleri gibi ROS'un ana kaynakları da bu yöntem ile uzaklaştırılabilmektedir. Özellikle oligozoospermik, testiküler ve dondurulmuş spermere uygulandığında elektroforetik yöntemlerden iyi sonuçlar alınmıştır. Fakat sperm hareketliliğinin negatif olarak etkilenmesi sonucu yöntemin güvenilirliği ile ilgili bazı soru işaretleri oluşmuştur (2,13). Ayrıca ayrıştırma aparatının kompleks bir yapıya sahip olması günlük rutin kullanım için sınırlayıcı bir faktör olabilmektedir (Şekil 1).

Bir diğer elektroforetik yöntem, spermin zeta (elektrokinetik) potansiyeli temel alınarak geliştirilmiştir (14). Sperm membranı ve etrafında ölçülen bu potansiyel matur bir sperm için -16 ila -20 mV'tur (15). Zeta potansiyeli kapasitasyonla birlikte azalmaktadır (16). Metodta; pozitif yüklü santrifüj tüpünün içine, yıkanmış olan sperm örneği pipetle alınır, lateks bir eldiven kullanılarak, 2–3 kez tüp içinde hafifçe karıştırılır. 1 dk sonra, tüp santrifüj edilir, tüp



Şekil 2. Zeta potansiyeli ile spermin ayrıştırılması.

Şekil 1. Elektroforetik yöntemle spermin ayrıştırılması-MicroflowCS- 10.

kenarına yapışmayan spermler ve diğer hücreler uzaklaştırılır (Şekil 2).

Zeta metodta, bir elektroforez ekipmanına ihtiyaç duyulmadığından ucuz ve yapılması kolaydır. Zeta işlemi, dondurup-çözülen sperm örneklerinde de başarılı olarak uygulanmıştır (17). Yüksek-voltajlı elektrik kullanımı bulunmadığından diğer yöntemlere göre daha güvenli bulunmaktadır. Fakat düşük sperm sayısının olduğu oligozoospermik örneklerde başarısı sınırlıdır. Ayrıca testiküler/epididimal sperm örneklerinde yeterince test edilememiştir (14).

Elektroforetik yöntemler, DGS yöntemi ile karşılaştırıldığında, elde edilen spermlerin maturite, morfoloji ve DNA bütünlüğünün yüksek, fakat motilitesinin düşük olduğu gözlenmiştir (14,17–19).

2- Apoptotik olmayan spermin seçimi

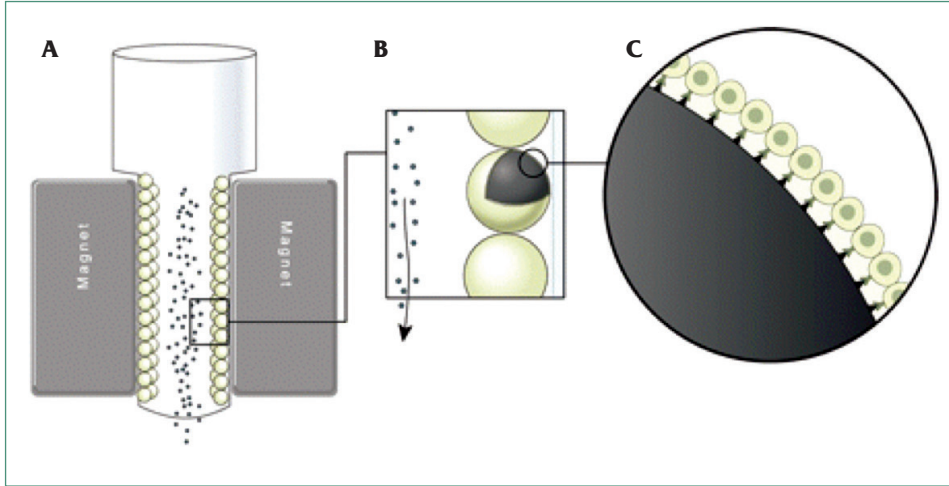
Sperm membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS)'in eksternalizasyonu (dışa yerleşimi), erken apoptozisin bir özelliğidir. Bu yöntemde bir manyetik-aktifte sorting system (MACS) kullanılarak, apoptotik olmayan spermin seçimi sağlanır. PS'nin eksternalizasyonu durumunda, Anneksin V ile bağlı paramagnetik mikrobeadlere bağlanarak apoptotik spermlerin işaretlenip ayrılması sağlanır (20).

İlk başta heterojen bir sperm hücre konsantrasyonu Anneksin V-konjuge mikrobeadlerle inkübe edilir, sadece

ekternalize PS'li apoptotik spermler bu beadlere bağlanır. Bead/sperm karışımı içine bir miknatis yerleştirilmiş MACS klonundan geçirilir. Bu miknatis, kolonun iç kısmında mikrobeadlerle işaretli hücrelerin tutulmasını, işaretlenmemiş hücrelerinde akıp giderek uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (21). MACS ile lökositler ve germ hücreleri uzaklaştırılmadığından, bu teknik DGS ile kombine uygulanmaktadır (22) (Şekil 3).

Apoptotik olmayan spermin Anneksin V manyetik hücre ayrıştırıcısı ile ayrıştırılması basit, hızlı, ucuz ve yüksek spesifiteye sahiptir. Bununla birlikte, teknikte özel laboratuvar ekipmanına ihtiyaç duyulmaktadır. Ek olarak DGS ve MACS kombinasyonu olması gerektiğinden santrifüj ve resüpsansiyon basamaklarının özellikle düşük sperm sayısının olduğu semen örneklerinde, olumsuz etkilerinin olduğu gözlenmiştir (23). MACS mikrobeadleri parçalanabilir ve bu durumdan hücre canlılığı etkilenebilmektedir (24). Serbest yüzen mikrobeadlerden kaynaklanan sorunun önüne geçmek için glass wool ayrıştırma kolonu (GW) kullanımı önerilmektedir (20).

DGS ile birlikte kullanılan MACS yöntemi sonrası elde edilen spermlerin yüksek motilite, canlılık, morfoloji, kriyosurvival oranı ile azalmış apoptoz ve DNA fragmantasyon oranına sahip olduğu öne sürülmektedir (23,25–27). Ek olarak başka bir çalışmada, bu sisteme Anneksin V-GW eklendiğinde, düşük caspase aktivasyonu olan ve yüksek



Şekil 3. MACS yöntemi ile spermin ayrıştırılması.

mitokondriyal membran potansiyeline sahip spermin seçilebileceği belirtilmiştir (20).

DGS ile birlikte kullanılan MACS ve DGS'nin karşılaştırıldığı çalışmalarda; özellikle anormal sperm parametrelerine sahip olan ve aynı zamanda apoptotik marker seviyeleri ve DNA fragmantasyon oranı yüksek saptanmış infertil hastalarda, DGS-MACS uygun bir yöntem olarak gözükmemektedir. Bu çalışmalarda fertilizasyon oranları bakımından bir farklılık gözlenmezken, DGS ile birlikte kullanılan MACS grubunda, embriyo bölünme ve klinik gebelik oranları daha yüksek bulunmuştur (28). Son yıllarda da MACS yönteminin kullanımı ile ICSI sonrası sağlıklı bebeklerin doğduğu rapor edilmiştir (29,30). Bu nedenle yüksek bir apoptoz insidansı ve DNA fragmantasyon oranının olduğu vakalarda ART protokollerinin içine MACS'ın yerleştirilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

3- Sperm membran olgunluğu (maturitesi) temel alınarak yapılan seçim

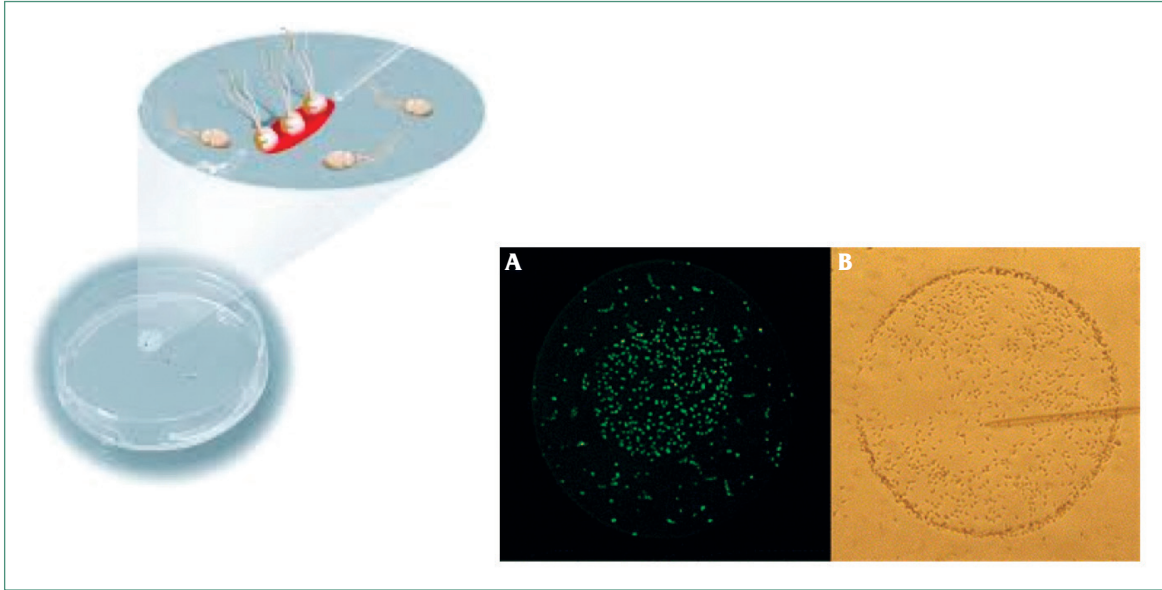
Sperm plazma membranında hyaluronik asit (HA) bağlanma bölgesinin oluşu, sperm maturitesinin en önemli işaretlerinden biridir. Bu yöntemde spermin seçimi bu özelliğe dayanılarak yapılmaktadır (31). Spermin seçilebilmesi için, HA'nin sabitlendiği 4 işaretli kuyucuğun olduğu "PICSİ dish" diye adlandırılan bir ürün geliştirilmiştir (MidAtlantic Diagnostics Inc., Mt Laurel, NJ, USA). Yıkanan spermin bir damlası HA noktasının kenarına bırakılır ve HA-bağlı sperm 15 dk sonra enjeksiyon pipeti ile toplanarak ICSI için kullanılır (32) (Şekil 4).

Metod, yüksek spesifiteye sahiptir ve minimal güvenlik endişesi vardır (33). Çünkü HA normalde servikal mukus,

kumulus hücreleri ve folliküler sıvısının normal bir bileşenidir. Sperm bağlanmasından önce hazırlık aşamalarında fazla zamana ihtiyaç duyulabilmektedir. Yöntem, özellikle mikroenjeksiyon yapılacak oosit sayısı fazla olduğunda sorun olabilmektedir.

Yine DGS yöntemi ile karşılaştırıldığında, HA bağlanma yöntemi sonrası elde edilen spermilerin canlılık oranları ve motilitesi yüksek, caspase-3 aktivitesi ve DNA fragmantasyon oranının düşük olduğu gözlenmiştir (33–36).

Sperm immatüritesi ve aneuploidinin altında yatan en yaygın faktör HspA2'nin ekspresyonunun azalmasından kaynaklanmaktadır (37). Bu nedenle, HA bağlanması kromozomal anomali sıklığı düşük olan matur sperm seçmede de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu da ICSI sonrası genetik komplikasyon riskini azaltabilmektedir. Fertilite tedavisi gören erkeklerin semen örnekleri çalışıldığı bir çalışmada, HA bağlı sperm ile bağlanmayan sperm karşılaştırıldığında otozomal dizomi, diploidi seks kromozomu dizomisi önemli oranda düşük bulunmuştur (32). Yine yapılan araştırmalarda HA bağlanma yöntemi ile ilgili olarak farklı ART sonuçları saptanmıştır. Kimi çalışmalarda bu sperm kullanıldığında sonuçlar ile herhangi bir ilişki saptanmamışken (36,38), bazılarında ise farklı ART parametreleri ile ilişkilerinin olduğu gösterilmiştir (39,40). Sonuç olarak, HA bağlı spermilerin pozitif etkisi, DNA bütünlüğü iyi olan, matur ve düşük DNA fragmantasyon oranları olan spermilerin seçimine imkan verdiği düşünülmektedir (39). Bununla birlikte, ICSI sonrası HA bağlı olmayan spermelerde sonuçların daha riskli olduğu, özellikle aneuploidi ve DNA fragmantasyon sıklığının yüksek olduğu tesbit edilmiştir (40).



Şekil 4. PICSİ petrisinde sperm görünümü.

4- Sperm ultramorfolojisi temel alınarak seçim

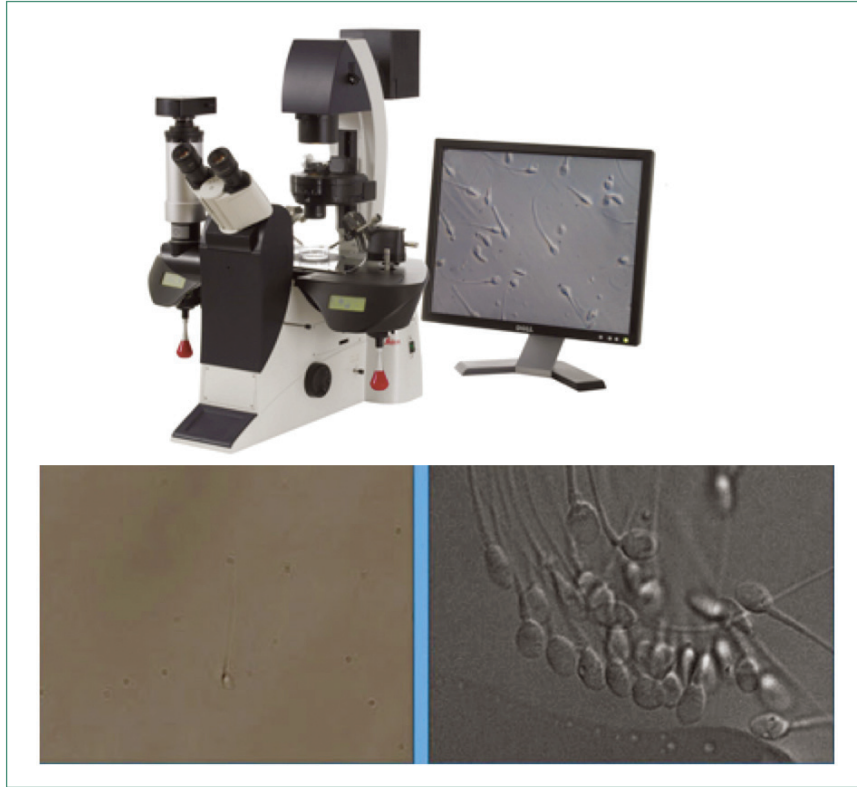
Sperm morfolojisi, erkekte in vivo ve in vitro fertilitenin en önemli belirleyicilerinden biri olarak tanımlanmaktadır (41–43). Mikroskop altında X1000 büyütmede boyanmış hücrelerin rasgele değerlendirildiği morfoloji sınırlandırılmış bir değerdir. Bununla birlikte ICSI sırasında X400 büyütme altında boyanmamış sperm seçilerek kullanılabilir (44). Dolayısıyla boyanmış örnekler semenin kalitesi hakkında önemli bilgiler verirken, ICSI için fazla bir katkısı bulunmamaktadır. Alternatif bir yöntem olarak, X6300 büyütme altında gerçek-zamanlı motil sperm organel morfoloji incelemesi (MSOME) ile normal sperm seçimi güvenli bir şekilde yapılabilmektedir (44). Bu işlem de, öncelikle rutin sperm hazırlama yöntemi ile hazırlanan motil sperm süspansiyonundan bir mikro-damlacık hazırlanır. Daha sonra dijital olarak büyütülmüş yüksek güçlü Nomarski optiklere adapte edilmiş inverted ışık mikroskobunda, immersiyon yağı altında değerlendirilmektedir. MSOME için 6 sperm organelinin tesbiti yapılmaktadır (akrozom, postakrozomal lamina, boyun, kuyruk, mitokondriler ve nukleus). Nukleusun hem şekil hemde kromatin içeriği (vakuolar alan) ayrıca değerlendirilmektedir. Çünkü organeller arasında sperm nukleusunun ART sonuçlarını etkileyen en önemli yapı olduğu belirtilmektedir (44). Daha sonra, intrasitoplazmik morfolojik olarak seçilen sperm enjeksiyonu yöntemi (IMSI), ICSI yönteminin bir modifikasyonu olarak geliştirilmiştir (44). Bu yaklaşım globozoospermide, akrozomal komponentler gibi spesifik sperm organellerinin belirlenmesi durumların-

da özellikle faydalı olduğu düşünülmektedir (45) (Şekil 5).

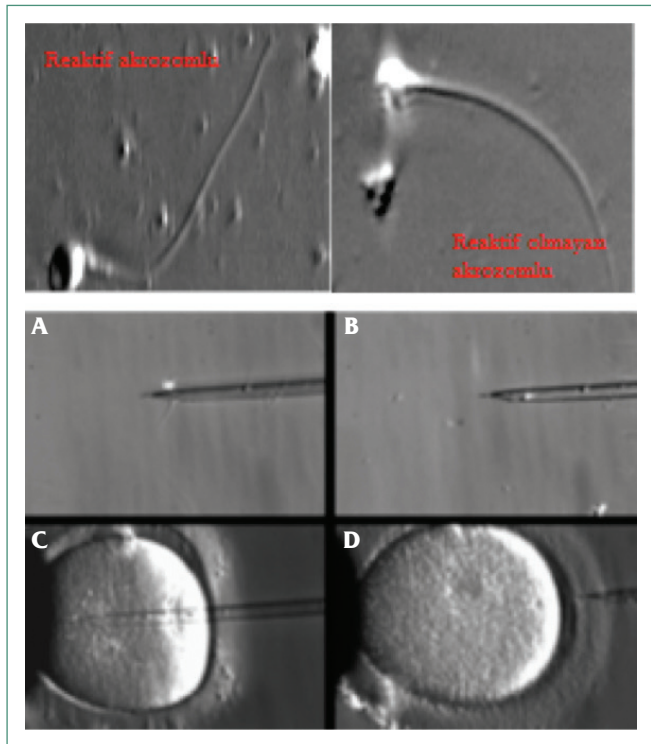
IMSI için sperm seçiminde kullanılan MSOME, uzun ve karmaşık bir işlemdir. Rutin ICSI işlem sürelerine ek olarak, yapılışı 5 saat kadar sürmektedir (46). Aynı zamanda önemli bir masrafı olan özel cihaza ihtiyaç duyulmaktadır. Sperm ultramorfolojisinin bir diğer sınırlayıcı etkisi, onun yaygın olarak kullanımını etkilemektedir. Bu da normal sperm ultramorfolojisinin sınıflandırılması yapan kişinin eğitimi ve tecrübesine bağlı olmasıdır. Gözlemciler arası farklılık MSOME sırasında sınırlayıcı olurken, diğer yandan teknik yüksek seviyede deneyime sahip olmayı gerektirmektedir (44).

Yapılan çalışmalarda, X13000 yüksek büyütme altındaki, nuklear vakuolün olmadığı immotil spermelerde yüksek mitokondriyal membran potansiyeli, düşük DNA fragmentasyon ve aneuploidi oranı gözlenmiştir (47). Büyük nuklear vakuollerin (≥ 50 sperm nuklear alanı) olduğu spermelerde, normal nukleuslu bir spermle karşılaştırıldığında, yüksek DNA fragmentasyonu ve denaturasyon gözlenmiştir (48). Gebelik ve canlı doğum oranları, ICSI'den ziyade IMSI'de daha yüksek bulunmuştur, düşük oranları da azalmış bulunmuştur (44,46). Fakat fertilizasyon, bölünme ve embryo morfolojisinde bir farklılık bulunmamaktadır (49–51). Bu çalışmalara ek olarak, bir metaanalizde 357 IMSI, 349 ICSI yapılmış ve sonuçlar karşılaştırıldığında; gebelik ve düşük oranları IMSI'de daha iyi, fertilizasyon oranlarında ise bir farklılık gözlenmemiştir (52).

Bir diğer optik sistem, sperm çift kırılımının (birefringence) belirlenmesi şeklindedir. Bu sistemde boyuna yer-



Şekil 5. IMSI için sperm seçimi.



Şekil 6. Polarize ışık mikroskobu ile reaktif akrozomlu sperm seçimi.

leşmiş olan (longitudinally) subakrozomal protein mikrofilyamentlerinin varlığına göre matur form belirlenmektedir (53). Sperm çift kırılımı polarize lenslerin olduğu bir in-

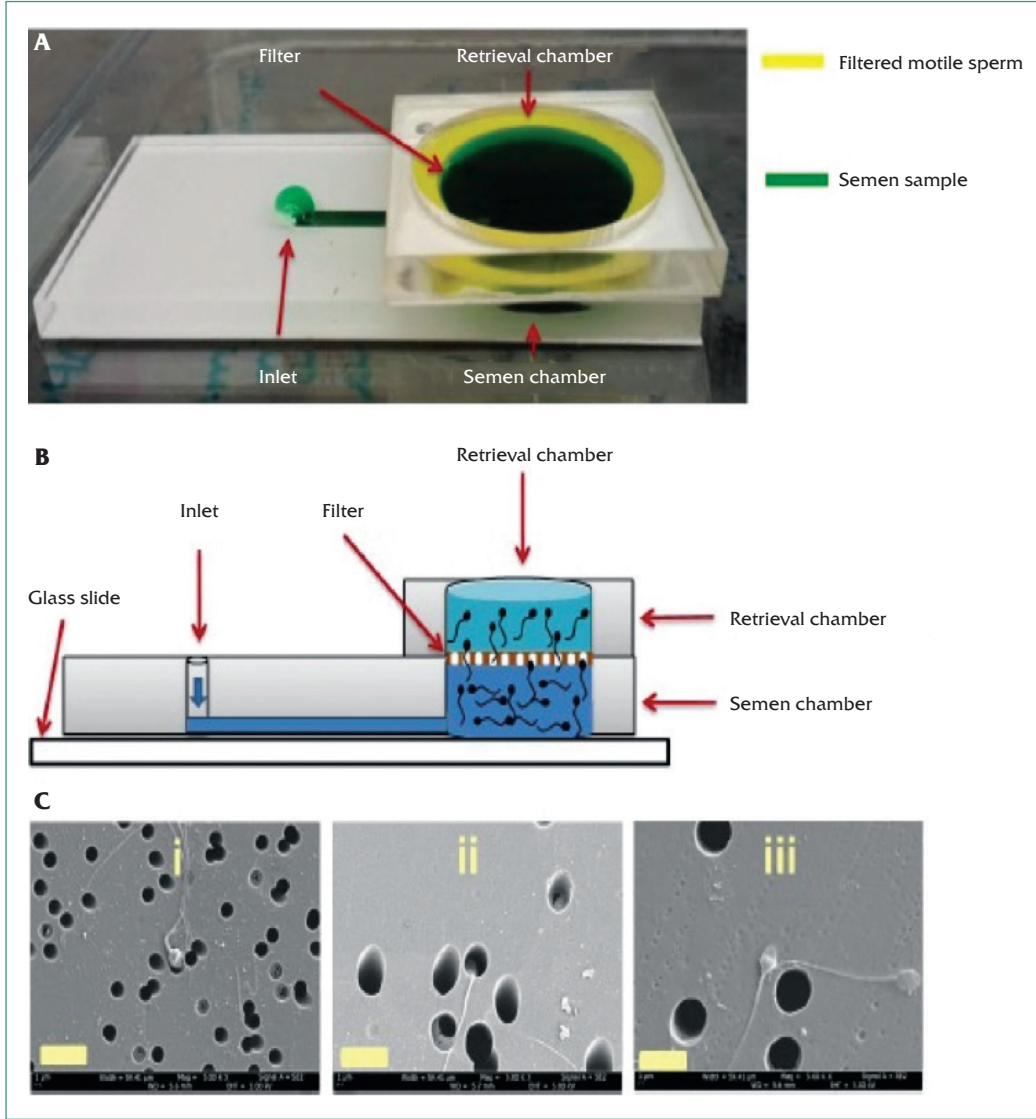
verted mikroskop ekipmanı kullanılarak değerlendirilmektedir. Çift kırılım ile sperm motilite ya da canlılığı negatif etkilenmeden ICSI sırasında reaktif akrozomlu sperm seçilmesi sağlanmaktadır (54) (Şekil 6).

Çift kırılıma sahip sperm mikroenjeksiyon için seçilebilmektedir ve bu sperm kalitesinin iyi olduğu öne sürülmektedir. Çift kırılımlı sperm oranı ile konsantrasyon, motilite ve canlılık gibi diğer sperm parametreleri arasında önemli bir pozitif korelasyon bulunmaktadır (54). MSOME ve IMSI'de olduğu gibi yine polarize mikroskobu ile sperm seçimi sırasında ek ekipman, zaman ve teknik deneyime ihtiyaç duyulmaktadır.

Yine sperm çift kırılımının değerlendirilmesi ile yapılan mikroenjeksiyon yöntemi ile rutin ICSI'nin kıyaslandığı ağır erkek faktörlü hastalarda bu yeni yöntemle yüksek gebelik oranı ve azalmış düşük oranı gözlenmiştir (54). Polarize mikroskoplar reaktif akrozomlu sperm seçimine imkan verdiği için, akrozom reaksiyonu olmayan spermle karşılaştırıldığında daha yüksek gebelik oranları alındığı gösterilmiştir (55).

5- Sperm DNA bütünlüğü artırılarak ve oksidatif stress azaltılarak yapılan seçim

Motilite, sperm kalitesinin değerlendirilmesi açısından



Şekil 7. Mikroakışkan kanal sistemi.

dan önemli bir parametredir. Motil sperm yüzdürme ve DGS yöntemleri ile elde edilmektedir (56,57). DGS yönteminde, işlemlerin santrifüj ile yapılması sebebiyle reaktif oksijen türevlerinin (ROS) artması ve bu nedenle DNA yapısında bozulmaların meydana geldiği (58,59), yüzdürme yönteminde ise elde edilen motil sperm sayılarında değişikliklerin olabildiği bilinmektedir (56,60,61). Bu noktadan yola çıkarak geleneksel sperm hazırlama yöntemlerinde ortaya çıkan sperm kayıpları ve DNA hasarının önüne geçebilecek, sperm seçimine yönelik geliştirilen yöntemlerden biride “mikroakışkan kanal sistemi (sperm-chip)” yöntemidir. Aslında bu yöntem geliştirilirken doğal ortamdan esinlenilmiştir. Bu sistem, spermin intrauterin ortam, servikal ve vajinal kanal mikroçevresine benzeyen bir mikrokanal içerikli çip özelliğindedir.

Mikroçipte, 1.5 mm kalınlığında Polimetilmetakrilat kombinasyonu (PMMA) ve 50 mikron kalınlığında çift taraflı yapışkan (DSA) film mikroakışkan kanalları oluşturmaktadır. Mikroakışkan kanal içinde sperm hareketini otomatik kaydını etkinleştirmek için çipe bir lensless charge-coupled cihaz (CCD) entegre edilmiştir. Entegre sistem mikroakışkan kanala yerleştirilmiştir. Mikroakışkan kanal ortamı serum ile desteklenmiş, taze human tubal fluid (HTF) medium ile önceden doldurulmuştur. Sperm örneği sütunun en üst kanal girişine pipetle yüklenir. Belirli uzunluktaki kanal sistemlerinden spermilerin yüzmeye beklenir. Yüzen spermier toplanarak ICSI için kullanılır. Ayrıca mikroçip birleştirilmiş cihaz (CCD) üzerine yerleştirilebildiğinden spermierin gölge hareketi izlenerek kayıt da yapılabilmektedir (62) (Şekil 7).

Genel olarak, spermin hazırlanması ve seçiminin, teknik açıdan zorlayıcı olduğu bilinmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, mikroakışkan cihazın kolay kullanımlı, tekrarlanabilir ve güvenilir olmasından dolayı avantajlı olduğu öne sürülmektedir (63). Mikrokanaldan oluşan mikroçip yöntemi santrifüj olmadan, sağlıklı, hareketli ve morfolojik olarak normal sperm eldesi için alternatif bir teknik olarak sunulmaktadır. Bu teknikte elde edilen sperm örnekleri yüzdürme yöntemi ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak düşük ROS ve DNA parçalanma oranlarının olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, yüzdürme yöntemi ile ROS yüzdesi %10.6±%1.1 iken, sperm MMSS çip (macro-microfluidic sperm sorter) kullanıldığında kanal boyutuna bağlı olarak ROS üretimi; %0.8±%0.4 (3 µm MMSS chip), %0.7±%0.1 (5 µm MMSS chip) ve %1.0±%0.1 (8 µm MMSS chip) şeklinde bulunmuştur. DNA fragmentasyon analizine bakıldığında ise, yüzdürme yönteminde %3.7±%1.2 sonucu alınmıştır. Çip kullanıldığında ise farklı kanal uzunluklarında %1.1±%0.3 (8 µm MMSS), %2.1±%0.7 (5 µm MMSS

chip), %3.4±%0.8 (3 µm MMSS chip) sonuçları alınmıştır. Kanal boyutu uzadıkça DNA fragmentasyonu olan sperm geride kalarak kanaldan geçişi engellenmektedir. Bu nedenle 8 µm çip kullanıldığında DNA fragmentasyonu yüzdürme yöntemine kıyasla belirgin bir ölçüde düşme göstermektedir (64).

Özetleyecek olursak; geliştirilen tüm bu yöntemlerde amaç; IVF ya da ICSI sırasında matur, apoptotik olmayan, DNA'sı bütün, morfolojik olarak normal spermi seçmektir. Yöntemlerin IVF ya da ICSI'de kullanımı sonucu elde edilen ilk sonuçlar fertilizasyon ve gebelik oranlarını olumlu yönde etkileyebilecek potansiyelde oldukları şeklindedir. Bu cesaretlendirici sonuçlara rağmen hala, yeterli hasta sayısında çalışılmamıştır. Çalışmaların çoğu, gebelik ve canlı doğum oranındaki farklılıkları sonuçlandırmak için yeterince güçlüdür, fakat bazıları yetersiz bulunmuştur. Gelişmiş sperm seçim yöntemleri için güvenlik ve etkinlik önlemleri tamamen alınmış olmalıdır. Özellikle doğan çocukların uzun süre takipleri yapılarak, etkinliği tesbit edilmelidir.

Kaynaklar

1. Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance. United States, 2005. *MMWR Surveill Summ* 2008; 57:1-23.
2. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of novel electroforetic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2005, Aug 20(8):2261-70
3. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C, Oehninger S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril.* 2009, Sep;92(3):835-48
4. Akerlof E, Fredricson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A. Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1987;10:663-669.
5. Le Lannou D, Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil.* 1988, Nov;84(2):551-6.
6. Francavilla S, Bianco MA, Cordeschi G, D'Abriozio P., De Stefano C, Properzi G, Francavilla F. Ultrastructural analysis of chromatin defects in testicular spermatids in azoospermic men submitted to TESE-ICSI. *Hum Reprod.* 2001, Jul;16(7):1440-8.
7. Perrard MH, Prisant N, Geoffroy-Siraudin C., Segretain D., Poin-tis G., Guichaoua MR., Durand P. Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. *Histochem Cytobiol.* 2009;47(5):S89-94.
8. Rengan AK, Agarwal A., van der Linde M., du Plessis SS. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012, Nov 17;10:92.
9. Alvarez Sedo C., Rawe VY., Chemes HE. Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Hum Reprod.* 2012 Jul;27(7):1912-21.
10. Schröter S, Derr P, Conradt HS, Nimtz M, Hale G, Kirchhoff C. Male-specific modification of human CD52. *J Biol Chem.* 1999 Oct 15;274(42):29862-73
11. Giuliani V, Pandolfi C, Santucci R, Pelliccione F, Macerola B, Focarelli R, Rosati F, Della Giovampaola C, Francavilla F, Francavilla S. Expression of gp20, a human sperm antigen of epididymal origin, is reduced in spermatozoa from subfertile men. *Mol Reprod Dev* 2004;69:235-240
12. Aitken RJ., Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidant in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 1988; 9, 367-376.
13. Engelmann U, Krassnigg F, Schatz H, Schill WB. Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Gamete Res* 1988;19:151-160.
14. Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril* 2006;85:481-486
15. Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *Int J Androl* 1991;14:340-347
16. Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L, Incerti L, La Sala GB, Rosati F, Focarelli R. Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after capacitation. *Mol Reprod Dev* 2001; 60:89-96.
17. 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;24:429-434.
18. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalae M, Deemeh MR, Mardani M, Moshtaghian J, Nasr-Esfahani MH. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. *Hum Reprod* 2009;24:2409-2416.
19. Razavi SH, Nasr-EsfahaniMH, DeemehMR, Shayesteh M, Tavalae M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia* 2010;42:13-19.
20. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2:127-133
21. Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1921-1925.
22. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander H-J, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod BioMed Online* 2005a;10:740-746. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil Steril* 2005b;83:1442-1446.
23. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation

- technique. *J Androl* 2008;29:134–142.
24. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11:231–238.
 25. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. *Arch Androl* 1994;33:157–162
 26. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg H, Schill W, B. & Kruger T. F. (2005). Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril*, Vol.83, No.3, pp. 635–42
 27. Romany L, Meseguer M, Gracia-Herrero S, Pellicer A, Garrido N. Magnetic activated sorting selection (MACS) of non apoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). Preliminary data. *Fertil Steril* 2010;94:S14
 28. Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:375–381.
 29. Polak de Fried E, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril* 2010;94:351 e315–358.
 30. Romany L, Meseguer M, Gracia-Herrero S, Pellicer A, Garrido N. Magnetic activated sorting selection (MACS) of non apoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). Preliminary data. *Fertil Steril* 2010;94:S14
 31. Huszar G, Sbarcia M, Vigue L, Miller D, Shur B. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997;56:1020–1024.
 32. 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;84:1665–1673.
 33. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 3:1616–1624.
 34. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004;10:365–372
 35. Ye H, Huang GN, Gao Y, Liu de Y. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2006;21:1545–1550
 36. Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, Borini A. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* 2009;19 Suppl 3:35–43.
 37. Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC, Huszar G. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod* 2001;16:1209–1217.
 38. Van Den Bergh MJ, Fahy-Deshe M, Hohl MK. Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2009;19:796–801.
 39. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavaloe M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:197–203.
 40. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. 'Physiologic ICSI': hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010a;93:598–604. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet* 2010b;27:13–16.
 41. Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5:172–178.
 42. VanWaaert J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001;7:495–500.
 43. Van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol Obstet Invest* 2005;59:86–91
 44. 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;23:1–8.
 45. Check JH, Levito MC, Summers-Chase D, Marmar J, Barci H. A comparison of the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using ejaculated sperm selected by high magnification versus ICSI with testicular sperm both followed by oocyte activation with calcium ionophore. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007;34:111–112
 46. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005;20:185–190.
 47. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Sellice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008;17:610–616.
 48. Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2008;17:42–45.
 49. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;12:19–25.
 50. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2008;16:835–841.
 51. Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Franco JG Jr. 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;150:42–46.
 52. Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cassia Savio 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;21:450–455.
 53. Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;36:333–339.
 54. Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 2008; 90:104–112.
 55. 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; 93:807–813.
 56. 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.
 57. Trounson, AO. and Gardner, DK. (2000) *Handbook of In Vitro Fertilization*, 2nd edn. CRC Press LLC, Boca Raton
 58. 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.
 59. Zini A., Finelli A., Phang D., Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm dna integrity. *Urology* 2000, 56, 1081-1084.
 60. 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.
 61. Ricci G., Perticarari 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.
 62. Assisted Reproductive Microchip Technologies to Improve Infertility. *ShuQi Wang, Fatih Inci and Utkan Demirci / January 14, 2015*
 63. Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Xiaohui Zhang, Imran Khimji, Umud Atakan Gurkan, Hooman Safae, Paolo Nicolas Catalano, Hasan Onur Keles, Emre Kayaalp and Utkan Demirci, Lab Chip, 2011,11, 2535-2540*
 64. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Waseem Asghar,1 Vanessa Velasco,1 James L. Kingsley,2 Muhammad S. Shoukat,1,3 Hadi Shafiee,1 Raymond M. Anchan,4 George L. Mutter,5 Erkan Tüzel,2 and Utkan Demirci 1,6*