

# IUI ve ICSI'de laboratuvar süreci

## Laboratory procedure of IUI and ICSI

Sibel Bulgurcuoğlu Kuran<sup>ID</sup>

### ÖZ

Yardımla üreme tedavilerinde (YÜT) kullanılan sperm hazırlama yöntemleri, temelde in vivo koşulları taklit ederek in vitro koşullarda kaliteli sperm seçimini ve düşük kaliteli spermleri elemeyi amaçlamaktadır. Buna rağmen klasik ya da geliştirilen yeni yöntemlerde başarı hala istenilen düzeyde bulunmamaktadır. YÜT'ün başarısını arttırmak için in vivo'daki seçim mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve seçilen spermlerin özelliklerinin belirlenmesi, sperm uygun olarak hazırlanması ve canlı doğum oranlarının artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Doğru sperm seçimi tek başına başarı açısından oldukça önemlidir. Özellikle ICSI işlemi sırasında, sperm motilite, morfoloji ve vitalite (canlılık) durumu değerlendirilerek fertilizasyon ve iyi embriyonun geliştirilmesi sağlanmaktadır. Kullanılan geleneksel hazırlık yöntemlerinde spermler sedimentasyon ya da migrasyon eğilimlerine göre ayrılarak, morfoloji ve motilite kriterlerine göre seçimleri gerçekleştirilmektedir. Sperm apoptoz ve benzeri belirtileri, DNA bütünlüğü, membran maturasyonu, foksiyonel mitokondri durumu ve ultra yapısı gibi sperm diğer karakteristik özellikleri tespit edilememektedir. Bu özelliklerin anlaşılmasını sağlayan yeni yöntemler kullanılmakta ve oldukça olumlu sonuçlar alınmaktadır. Fakat en iyi metodu seçmek için daha fazla randomize kontrollü çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** sperm, sperm seçimi, IUI, ICSI

### ABSTRACT

Basically, the sperm preparation methods which are used in assisted reproductive treatments (ART), aim to eliminate low quality sperm and select the quality sperm in vitro conditions by simulating in vivo conditions. Nevertheless, success rate is still under the desired goal in the classical or new developed methods. A better understanding of the selection mechanisms in vivo, determination of the characteristics of selected sperm, appropriately preparation of sperm, and increasing live birth rates are needed to increase the success of ART. Choosing the good quality sperm is very important for ART success. Especially during the ICSI procedure, sperm motility, morphology and vitality status are evaluated before choosing and fertilization and good embryo development are provided. In the traditional preparation methods, sperms are separated in respect of their tendency of sedimentation or migration and they selected according to their morphology and motility criteria. Apoptosis and similar symptoms of sperm, DNA integrity, membrane maturation, functional mitochondria status, ultrastructure and other characteristics of sperm cannot be determined. Besides, new methods are used which ensure understanding of these features and correspondingly promising results are obtained. But, to select the best method, there must be more randomized controlled study.

**Keywords:** sperm, sperm selection, IUI, ICSI

## GİRİŞ

İnsan üreme fizyolojisine göre, bir grup sperm hücresi, yumurtalıkta ampulla bölgesine ulaşıncaya kadar etkili bir seçilime maruz kalmaktadır. Yolculuğu sırasında dişi üreme sisteminin farklı bölümlerinde bir takım değişikliklere uğramakta ve adım adım seçilimi gerçekleştirilmektedir.

*İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve Infertilite Bilim Dalı, ÜYTE Merkezi, İstanbul, Türkiye*

### Yazışma Adresi/ Correspondence:

Dr. Sibel Bulgurcuoğlu Kuran  
İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve Infertilite Bilim Dalı, Tüp Bebek Merkezi, Çapa 34093 İstanbul, Türkiye  
Tel: +90 533 515 41 76  
E-mail: sbulgurcuoglu@yahoo.com

**Geliş/ Received:** 21.06.2019

**Kabul/ Accepted:** 09.08.2019

Ejakulattan atılan spermler, vajinada biriktikten kısa bir süre sonra, seminal plazmadan ayrılarak, morfoloji ve hareketlilik bakımından seçilimin yapıldığı yüksek oranda hidrate olan servikal mukusa ulaşmaktadır. Aynı zamanda burada seçilen spermler, düşük oranda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeren plazma membran içeriğine de sahiptir. Daha sonra, hiperaktivasyon ve kapasitasyon için seçilimin yapıldığı uterusu taşınarak, işlevsel olmayan spermler elimine edilmektedir. Birçok hayvan türünün aksine, insanda önemli bir işlevi bulunmayan uterotubal kavşaktan geçildikten sonra, spermler fallop tüpünün isthmusuna ulaşmaktadır. Bu bölgede spermler 5 güne kadar saklanabilmektedir. İsthmusa ve daha sonra da ampullada (yumurtalık kanalı) bulunan follikülün kümülüsüne ulaşan spermler, kapasitasyon, termo-kemotaksis duyarlılığı ve DNA bütünlüğü için seçilime maruz kalmaktadır. Son olarak, kümülusun içinden geçildikten sonra sperm, başka

bir morfolojik seçilimin gerçekleştiği zona pellusida'ya bağlanmaktadır. Burada erkek germ hücreleri zona pellusidaya bağlama kabiliyeti ve DNA bütünlüğü için de ayrıca test edilmektedir. Ancak bu aşamadan sonra yumurtayı döleyip, yeni bir bireyin genomuna katkı sağlayacak en iyi sperm seçilimi gerçekleşmektedir.<sup>[1,2]</sup>

Ampulla bölgesine ulaşan hücreler özel bir yapıya sahip olduğundan özelliklerinin incelenmesi önem taşımaktadır. Günümüzde yardımla üreme tedavilerinde (YÜT) kullanılan sperm hazırlama yöntemleri de in vivo koşulları taklit ederek, in vitro koşullarda kaliteli sperm seçimini, bir başka deyişle fertilizasyon kapasitesi düşük spermeleri elemeyi amaçlamaktadır. Klasik olarak kullanılan ve geliştirilen yeni yöntemlerde temelde baz alınan aslında bu noktalar olmakla birlikte başarı hala istenilen düzeyde bulunmamaktadır. YÜT'ün başarısını arttırmak için in vivo'daki seçim mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve seçilen spermelerin hangi özellikte olduğunun belirlenmesi, sperm uygun olarak hazırlanması, seçimi için uygun stratejilerin tasarlanması ve canlı doğum oranlarının artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

İyi kaliteli bir sperm tanımlarken baş, boyun ve kuyruktan oluşan 3 ana bileşene sahip olması gerekmektedir. Organel yapısının yanı sıra fonksiyonel özelliklerinin de tam olması gerekmektedir. Sperm fertilizasyon kapasitesini belirleyen en önemli iki parametre morfoloji ve hareketliliktir.<sup>[3]</sup> Bu parametrelerin dışında son yıllarda spermdeki oksijen radikali türevlerinin varlığı, DNA fragmentasyonu, apoptoz ve mitonkondriyal zar potansiyelinin önemli olduğunu gösteren çalışmalar da dikkat çekmektedir.<sup>[4-6]</sup>

YÜT'de infertil çiftin değerlendirilmesi sırasında, semen özelliklerinin doğru incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde yaygın olarak sayma kamaraları (Neubauer,

Burker, Makler vs.) ile ışık mikroskobu altında sperm konsantrasyonu, motilite, morfoloji, aglütinasyon ve hücresel elementlerin değerlendirilmesi altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte yakın zamanda geliştirilen birçok yeni teknik ile özellikle en iyi sperm seçilebilmesi için önemli mesafeler kat edilmiştir. Genel olarak fertiliteye ait normal değerlerle ilgili olarak sperm değerlendirmesinde çoğu merkez Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO-2010) kriterlerini esas almaktadır (Şekil 1).<sup>[3]</sup>

## YÜT'DE SPERMİN SEÇİMİ VE HAZIRLIĞI

YÜT'leri infertilitenin medikal ya da cerrahi tedavi ile düzelmeyeceği durumlarda başvuru yöntemlerdir. İlk olarak IUI (İntrauterin inseminasyon), daha sonra in vitro fertilizasyon (IVF) daha ileri aşamalarda ise intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulamaları gerçekleştirilebilmektedir. Erkek açısından baktığımızda, öncelikle semen analizi sonrasında oligozoospermi (<15 milyon spermatozoa/ml), astenozoospermi (<%32 motil spermatozoa) ve teratozoospermi (<%4 normal form) ayrımının yapılması önemlidir. Çoğu kez her üç patoloji, oligo-asteno-teratozoospermi (OAT) sendromu şeklinde de karşımıza çıkabilmektedir. Standart mikroskopik incelemede sperm olmadığı azoospermi, şiddetli OAT sendromu olan kriptozoospermi (<1 milyon spermatozoa/ml) ve akrozom yokluğu ya da eksikliğini ifade eden globozoospermi durumlarının belirlenmesi sperm hazırlığı açısından da önem taşımaktadır.

**İntrauterin inseminasyon (IUI)**, over stimülasyonunu (OS) takiben semenin laboratuvar ortamında ölü sperm, lökosit ve seminal plazmadan ayrıştırılarak hareketli ve normal morfolojideki spermelerin transservikal yoldan uterin kaviteye verilmesi işlemidir. IUI başarısını; infertilite süresi, progresif motil sperm sayısı, endometrial kalınlık, preovuluar

Parametre	Alt referans limiti
Semen hacmi (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Toplam sperm sayısı (10 <sup>6</sup> /ejakülat)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 <sup>6</sup> /ml)	15 (12-16)
Toplam motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
İleriye doğru hareketlilik (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3,0-4,0)
Uzlaşılan diğer eşik değerler	
pH	≥ 7,2
Peroksidaz pozitif lökositler (10 <sup>6</sup> /ml)	< 1,0
MAR testi (partiküllere bağlı hareketli sperm, %)	< 50
İmmunobead test (boncukların bağlandığı hareketli sperm, %)	< 50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	≥ 2,4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	≥ 13
Seminal nötral glikozidaz (mU/ejakülat)	≥ 20

Şekil 1. Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (WHO 2010)

follikül sayısı ve diğer sperm parametrelerinin etkilediği bilinmektedir.<sup>[7,8]</sup> IUI tedavisi, açıklanamayan infertilite gibi normal sperm parametreleri ya da hafif erkek faktörünün olduğu hastalar için ilk basamak tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir.<sup>[9,10]</sup> Yapılan birçok çalışmada genel kabul edilen görüş, IVF'te gebelik oranlarının sperm morfolojisiyle ilişkili olduğu belirtilirken, IUI için böyle bir bağlantının geçerli olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir.<sup>[11,12]</sup> Yapılan bir çalışmada IUI'da, kadının yaşı >35, insemine edilen hareketli sperm sayısının  $<5 \times 10^6$ /ml veya normal sperm morfolojisi  $<30\%$  olduğu durumda başarı şansının oldukça azaldığı belirtilmektedir.<sup>[13]</sup> IVF, doğal fizyolojiye en yakın in vitro fertilizasyon yöntemidir. Spermiler ile yumurta aynı kültür ortamında inkübe edilerek döllenme ve embriyo gelişimi elde edilmektedir. Bu yöntem, ilk etapta sperm konsantrasyonu ve ileri hızlı hareket oranı normal olan hastalar için kullanılmaktadır. Ayrıca sperm hareketliliğinin yanı sıra, kadın yaşının normal sınırlarda, oosit sayısı, maturite ve kalitesinde iyi olması gerekmektedir. ICSI, erkek faktörü grubu öncelikli olmak üzere, bütün hasta gruplarına uygulanabilen yöntemdir. Hazırlanan sperm örnekleri, ICSI için özel hazırlanan petri kaplarına alınarak, uygun sperm seçilmektedir. Bu işlemler 400X büyütme altında ters ışık mikroskopları kullanılarak yapılmaktadır. Seçilecek sperm enjeksiyon petrisindeki polivinylpyrolidone (PVP) damlasına alınarak, hareketi yavaşlatıldıktan sonra seçim işlemi gerçekleştirilmektedir.

Yardımla üreme tedavilerinde, hasar görmeden en iyi sperm elde edilebilmesi için farklı hazırlık yöntemleri bulunmaktadır. Hazırlanan bu sperm örneklerinde de en iyi durumda olanlar seçilerek, IVF ve ICSI uygulamalarında kullanılmaktadır. Sperm seçimi, YÜT başarısı açısından oldukça önemlidir. Özellikle ICSI işlemi sırasında, tek tek sperm motilite, morfoloji ve vitalite (canlılık) durumu değerlendirilerek fertilizasyon ve iyi embriyonun geliştirilmesi sağlanmaktadır. Bu noktada bazı önemli anormal sperm yapı durumlarından bahsedilmesinde yarar bulunmaktadır.

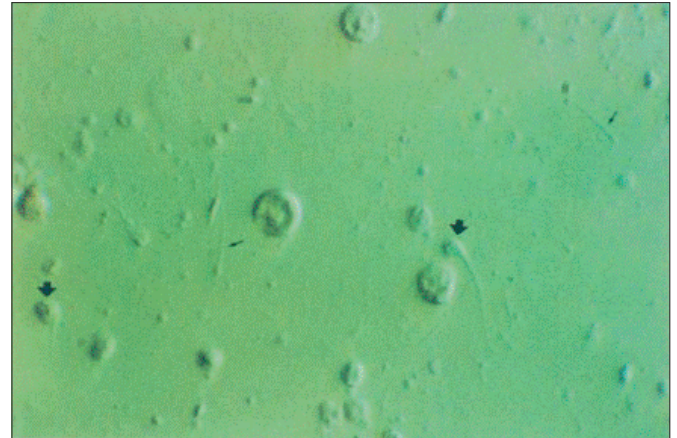
## ICSI İÇİN SPERM SEÇİMİ

Genel olarak, seçilen sperm ileri hızlı hareket oranının en az %32, a (+4) ve b (+3) özelliğinde olması gerekmektedir.<sup>[3]</sup> Baş kendi etrafında dönerek hareket ederken, kuyruk yüzme-yi sağlayan ileri hareketi gerçekleştirmelidir. Atipik ve yavaş hareketi olmamalıdır. Motilitenin az olması ya da olmaması (tam astenospermi-absolute asthenospermia) ICSI'den ziyade IVF sonuçlarının olumsuz etkilemektedir. Ancak tam astenospermi durumunda ICSI işlemi yapılsa bile iyi sonuçlar alınamamaktadır. Buradaki sorun immotil spermilerin, canlılık (vitalite) durumlarının anlaşılmasından kaynaklanabilmekte, mutlaka canlılığın tesbit edilmesi gerekmektedir.

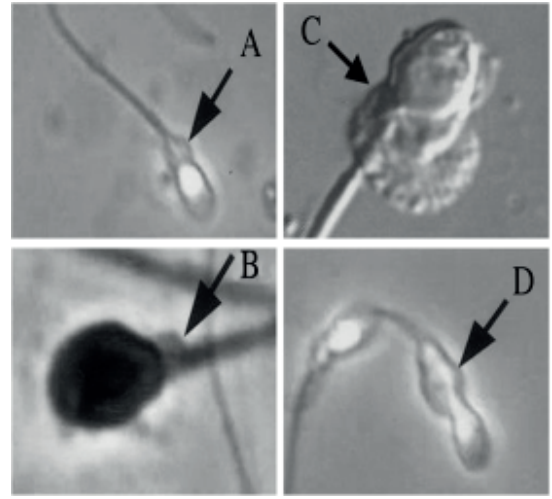
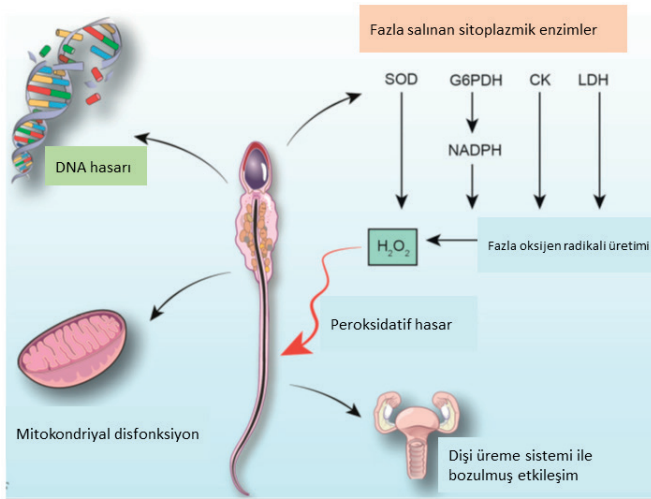
YÜT laboratuvarlarında kullanılan vitalite testleri ikiye ayrılmaktadır. Tanı amaçlı, eozin-nigrozin ve eozin Y testleridir. Bir diğeri de, gerçek zamanlı, ICSI sırasında kullanılan hipoosmotik şişme testi/sperm curling test, pentoksifilin/teofilin ile motilitenin uyarılması, mekanik olarak dokunma (non-kontakt diod lazer kullanımı), polarize ışık mikroskobu kullanılarak, normal baş ve midpiecein kısmı çift kırılımlı yansımalarının belirlenmesi şeklindedir.<sup>[14-16]</sup>

Hareketlilik ve vitalitenin yanısıra ters ışık mikroskobunda değerlendirdiğimiz bir diğer önemli parametre morfolojidir. Fertilitiyi ciddi oranda etkileyebilen teratozoospermi durumunda baş ve boyun anomalileri ön planda bulunmaktadır. Sperm baş anomalileri, temelde kromatin ve akrozom anomalilerine neden olmaktadır.<sup>[17,18]</sup> Özellikle ağır teratozoospermiye rastlanılan çekirdek patolojilerinin çoğunda kromatin kondensasyonunda değişiklikler söz konusudur. Bu nükleer anomaliler, sıklıkla ileri amorf baş defekti olan spermelerde gözlenmektedir.

Amorf baş, sık rastlanılan anomalilerdendir ve düzensiz bir baş kontur yapısı mevcuttur. Ağır formlarında sperm başlarında iri vakuoller, akrozom eksikliği, anormal kromatin maturasyonu ve kompaktlaşması gözlenmektedir (Şekil 5).<sup>[19]</sup> Elektron mikroskobisi ile bakıldığında, düzensiz baş şekillerinde büyük (1-3 µm) parlak ya da boşluklar şeklinde (lacuner), alanlar gözlenmiştir. Normal kompakt kromatinden belirgin bir şekilde ayrılmış ve bir membranla sınırlandırılmamıştır. Bu vakuoller, kromatin yapı ve fonksiyonunda ciddi defektleri işaret etmektedir. İnfertil hastalarda, vakuollerden dolayı olan kromatin kondensasyon defektlerinde fertilizasyon oranları düşmüş, anormal embriyonik gelişim ve de ilk trimester gebelik kayıplarının olduğu gözlenmiştir.<sup>[7]</sup> Önemli sorun teşkil eden baş anomalilerinden iribaş-megalohead ve noktabaş-pinhead çoğunlukla mikroenjeksiyon için kullanımı uygun olmayan spermelerdir. Megalohead'te sıklıkla çift ya da çoklu kuyruk mevcuttur, genel olarak ejakulatta ve testiküler örneklerde megalogalo ve pinhead spermelere birlikte rastlanmaktadır. (Şekil 2)



Şekil 2. Megalo-pinhead görünümü (Kahraman S et al. Hum Reprod. 1999)



**Şekil 3.** Sitoplazmik dropletin büyüklüğünün fazla olduğu durumdaki patolojik etkisinin diyagramı Sitoplazmik droplet (A, B) ve büyük sitoplazmik droplet (C, D) görünümü (Rengan et al. Reprod Biol Endocrinol.2012)

Megalohead spermelerde, kromozomal olarak poliploidi durumu söz konusu olduğundan bu spermelerle yapılan ICSI işlemi sonrasında fertilizasyon ve gebelik oranlarının düşük olduğu gözlenmiştir.<sup>[20-22]</sup> Pinhead spermelerde ise; genellikle başın boyutunun çok küçük olması ile birlikte, orta ana hat kuyrukla birleşmiştir. Başsız (asefalik) olarak adlandırılan bu spermelerin spermatogenezin geç evresinde sperm bağlantı parçasının oluşumunda, proksimal sentriollerde ve nükleer yapılarda defekt söz konusudur. Baş ve orta kısım bağlantısı düzgün değildir.<sup>[23]</sup> Akrozom yoktur ya da çok azdır. Bu spermelerle yapılan mikroenjeksiyon sırasında fertilizasyonun gözlemlendiği, fakat singami (PN'lerin birleşmesi) ve embriyo bölünmesinin gerçekleşmediği belirtilmektedir.<sup>[24]</sup> Bu spermelerde mevcut olan sentrioldeki bozukluk, zigotta mikrotübül yapısının oluşmasına engel olmaktadır.<sup>[25]</sup>

Bir diğer baş anomalisi de globozoospermi durumudur ve akrozom eksikliği ya da yokluğu söz konusudur. Golgi organelinden gelişen akrozom sperm başının 2/3'nü kaplamaktadır. Bu vakalarda başarı büyük oranda örnekteki globozoospermik sperm oranına bağlıdır. Yüzde 100 yani komplet olan örneklerde başarı çok düşük olmakla birlikte, %50-60 civarında olan parsiyel globozoospermi de başarı biraz daha fazladır. Akrozomsuz bu spermelerin oositi aktive edememesinden dolayı fertilize etme kapasitesi bulunmamaktadır. Bazı çalışmalarda globozoospermide  $Ca^{+2}$  iyonofor, stronsiyum ya da elektriksel aktivasyon yapılarak oosit aktivasyonu gerçekleştirilmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu spermelerin kullanımında başarı hala sınırlı düzeydedir.<sup>[18]</sup>

**Sitoplazmik damla (droplet)**, seminfer tübül tarafından salgılanan spermatozoanın boyun, orta parça ve bazen de kuyruğunda görülen sitoplazma parçacıklarıdır. Bu yapı lizozomal enzimden zengindir. Ejakülatta dropletlerin

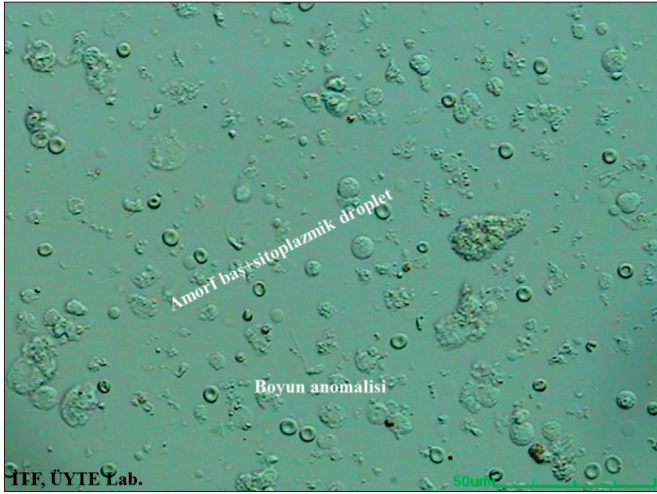
varlığı, yoğun dış fiberler ve fibröz kılıf gibi yapıların eliminasyonuna bağlı epididimal fonksiyon bozukluğu ve fertilizasyonun azalması ile birliktedir. Geçmişte sitoplazmik damlaların normal sperm başı alanının üçte birinden büyük olması anormal olarak değerlendirilirken, günümüzde bu oranın % 50'ye çıktığı bildirilmektedir.<sup>[26]</sup> Bu durum spermiyogenez sırasındaki bir duraklama sonucu, midpiece-orta kısmında fazla sitoplazmanın kalmasıdır. Bu parçacıklarda sitoplazmadaki enzimlerin seviyesi artmıştır ve reaktif oksijen ürünleri fazla miktarda bulunmaktadır. Sitoplazmik dropletin büyüklüğünün fazla olduğu durumda, sperm motilitesi, morfolojisi ve fertilizasyon potansiyeli olumsuz etkilenmektedir (Şekil 3).<sup>[27]</sup>

**Boyun ve kuyruk anomalileri** genellikle, motilite kusuru olarak ortaya çıkmaktadır. Azalmış veya kaybolmuş motilite durumlarında birçok aksonem defektinin varlığının olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte önemli kuyruk anomalilerinden biri olan nadir rastlanan kısa, kalın kuyruk (tail stump) durumudur (Şekil 4).



**Şekil 4.** Kısa, kalın kuyruk (tail stump)

Boyun ve kuyruk anomalileri spermiyogenezin son dönemlerine ait bir fonksiyon bozukluğudur. Kısa kuyruk sendromunda; normalde 9+2 olan aksonem yapısı; 9+1 veya 9+0 şeklinde olup, dynein kolları yada santral ikili mikrotübüller bulunmamaktadır. Sperm başı normaldir ancak mitokondriler yerlerine yerleşmemiştir. Kısa kuyruk, fibroz kılıf displazisinde (DFS)'de rastlanan tipik sperm görüntüsüdür. Genellikle boyun anomalilerinde kalın boyun ya da droplet gözlenmekle birlikte, mitokondriyel anomalilerin varlığı söz konusudur. Boyun anomalilerinde ciddi motilite bozukluklarının yanısıra, düşük fertilizasyon potansiyeli izlenmektedir. Bu hastalarda ICSI yöntemi kullanılsa bile, fertilizasyon, gebelik ve sağlıklı çocuk doğma oranları düşük olarak gözlenmektedir.<sup>[28]</sup>



Şekil 5. Testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile edilen amorf baş+sitoplazmik dropletli ve boyun anomali sperm

## SPERM HAZIRLIK YÖNTEMLERİ

Genel olarak kullanılan klasik hazırlık yöntemlerinde amaç; iyi kalitedeki sperm hareketli ve anormal morfolojiye sahip olan sperm ve semenin içerdiği debriden ayrılarak belli bir hacimde konsantre edilmesidir. İdeal sperm ayırma tekniği;

- (i) Hızlı, kolay ve uygun maliyetli olmalı,
- (ii) Mümkün olduğunca hareketli sperm izole edilmeli,
- (iii) Sperm hücrelerinin hasarına veya fizyolojik olmayan değişikliklerine neden olmamalı,
- (iv) Ölü sperm, lökositler, bakteriler ve diğer hücreler elimine edilmeli,
- (v) Dekapasitasyon faktörleri, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi toksik veya biyoaktif maddeler elimine edilmeli,
- (vi) Büyük ya da çok düşük semen hacimlerinin işlenmesine izin vermelidir.

Uygulanacak sperm hazırlama protokolünün seçiminde semen analizi kritik önem taşımaktadır. Semen analizinin

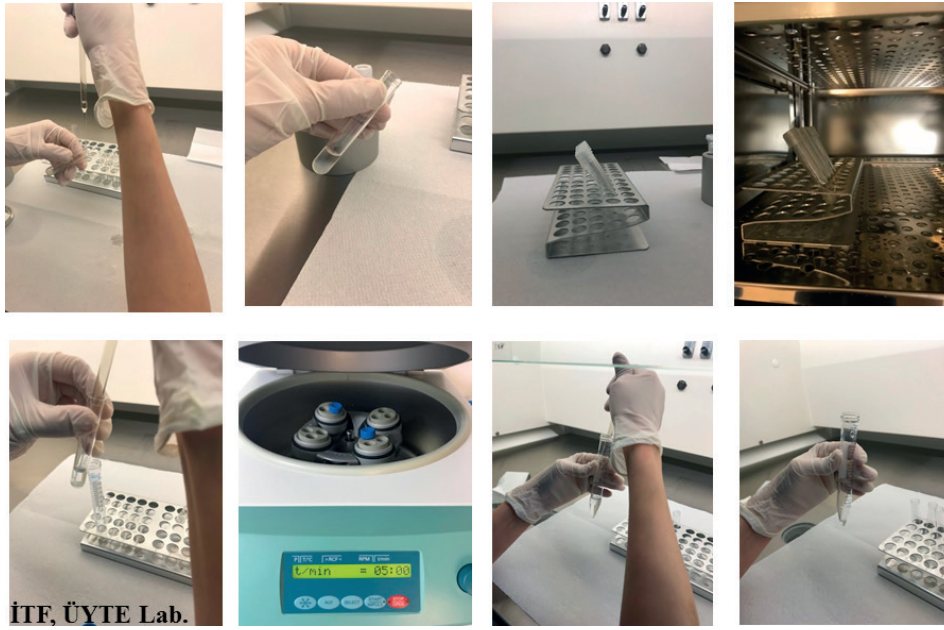
doğru olarak değerlendirilmesinden sonra ancak uygun sperm hazırlık yöntemine karar verilmektedir. En sık kullanılan klasik yöntemler; yıkama, yukarı yüzdürme (SU) ve yoğunluk gradient (DG) yöntemleridir. Örneğin; normozoospermik hastalarda hem SU, hem de DG yöntemiyle yeterli sayıda ileri hızlı hareketli sperm elde edilirken, oligoastenoospermik vakalarında dansite-gradient yöntemiyle elde edilen hareketli sperm sayısı daha yüksektir.

## Yıkama Yöntemi

YÜT'te kullanılan ilk yöntemlerden biri olan semenin yıkama solüsyonu ile hazırlanarak sperm elde edilmesidir. Tekniğin prensibi; tüm semenin santrifüj yapılması ile (400 g'de 10 dk) spermelerin seminal plazmadan ayrılması ve konsantre edilmesidir. Yıkama yöntemi SU, DG, manyetik hücre ayırma gibi farklı sperm hazırlama protokolleriyle kombine olarak uygulanabileceği gibi, normozoospermik vakalarda tek başına hızlı IUI uygulamaları için de kullanılabilir. Ancak, oluşan pellet motil sperm yanı sıra ölü sperm hücreleri, lenfositler ve debris de içermektedir. Pelletteki ölü sperm ve lenfositler serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu durumda sperm membranında bulunan yağ asitlerinin akışkanlığının bozulmasına yol açarak, fertilizasyon sürecinde spermün füzyonunu olumsuz etkileyebilmektedir. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin, sperm DNA'sında kırıklara yol açtığı da bilinmektedir. Bu nedenlerle klasik IVF'te bu yöntemin kullanılması sonucunda fertilizasyon oranlarında azalma gözlenebilmektedir. Yıkamanın bir diğer modifiye formu olan çöktürme yöntemi özellikle ejakülatta sperm sayısının çok düşük olduğu kriptozoospermik vakalarında; yüksek hızda, kısa süreli santrifüjü (1800 g, 5 dk) takiben spermelerin konsantre edilerek hazırlanması sırasında sıklıkla kullanılmaktadır.

## Yüzdürme Yöntemi-Swim Up (SU)

IVF olgularında sıklıkla tercih edilen sperm hazırlama yöntemi olan yüzdürme, sperm sayısının normal, orta düzeyde ve ileri hareketli oranının yüksek olduğu örnekler için kullanılması uygundur. Yöntemde, spermün ileri hareket özelliği ön planda olduğundan ağır oligospermi ve astenospermi olgularında kullanışlı değildir. Hazırlık sonrasında da, özellikle ileri hareketli sperm yüzdesi artmış ve normal morfoloji oranı yüksek temiz fraksiyona sahip sperm elde edilmiştir. Bu şekilde elde edilen sperm IUI, IVF ve ICSI için güvenle kullanılabilir.<sup>[29]</sup> Yüzdürme yöntemi, doğrudan semenin kullanılması ya da santrifüj sonrasında seminal sıvı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen sperm pelleti kullanılarak yapılabilir. Ancak WHO'nun



Şekil 6. Yüzdürme yöntemi –swim up (SU)

kılavuz kitabında, yüzdürme yöntemi öncesinde santrifüjün kullanılması ile sperm membranına hasar verilebileceği belirtilmektedir.<sup>[30]</sup> Teknik kısaca; yıkama aşamasından geçirilmiş yada yıkanmamış örnekler eşit miktarlarda steril tüplere alınarak, üzerine yaklaşık 1 ml kültür sıvısı eklenmesinden oluşmaktadır. Tabakalanmanın ardından örnek, yüzey alanını artıracak şekilde 45° eğimle, 37°C'de ve 1 saat süreyle inkübe edilmektedir. Normozoospermik hastalarda ileri hareketli spermelerin temiz kültür sıvısının üst ¾'lük kısma yüzmesi beklendikten sonra, üst faza yüzen spermeler toplanarak kısa bir santrifüje tabii tutulmaktadır.

### Yoğunluk Gradient Yöntemi – Dansite Gradient (DG)

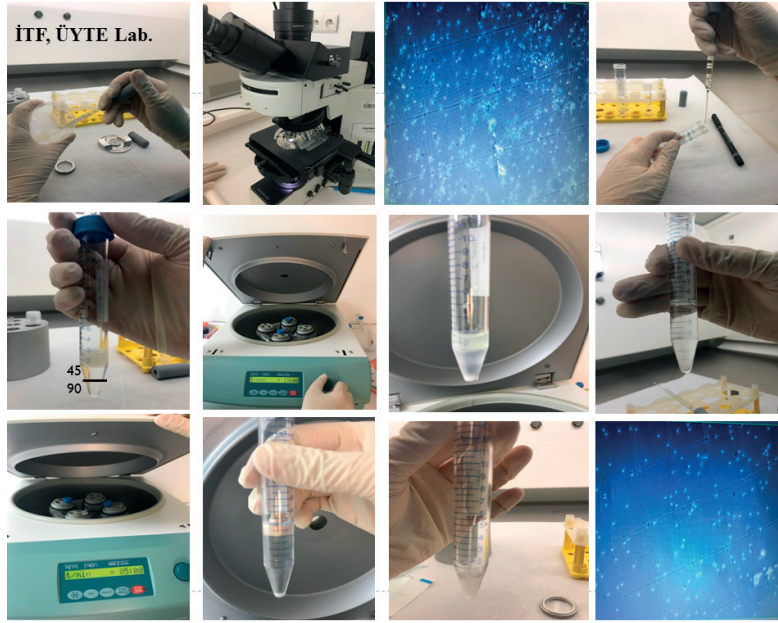
DG yönteminde, ejakülat steril konik bir tüp içerisinde farklı yoğunluktaki sıvı katmanlardan (silan kaplı kolloidal silica partikülleri) oluşturulan bir sütun üzerine yayılır. Bu sıvılar tek katman olursa devamlı (continuous), birden fazla katmanın üst üste hazırlanması şeklinde ise devamsız (discontinuous) gradient santrifügasyon olarak isimlendirilmektedir. Ayrılma, hücre ve/veya diğer partiküllerin yoğunluk farklarına göre, santrifüj kuvvetine karşı gradient sıvılarının gösterdiği direnç ile gerçekleşmektedir.

Bu yöntem de uyarlamalara açıktır ve hastadan alınan örneğin özelliğine göre farklı şekillerde uygulanabilmektedir. Motil sperm sayısı  $4-5 \times 10^6/\text{mL}$ 'den yüksek olduğu durumlarda iki tabakalı (%40–80 ve %50–90) yoğunluk gradient yöntemi kullanılmaktadır. Mini-perkol olarak isimlendirilen üç tabakalı (%90, %70, %55) gradient sistemi yine normal değerlerin altında özelliği olan örnekler ve viral

yük söz konusu olduğunda tercih edilmektedir. Buna göre sıklıkla tercih edilen yoğunluk kombinasyonları literatürde yüksek fertilizasyon ve gebelik oranlarıyla karakterize olan %40–80 ve %50–90'dır. Bu şekilde elde edilen spermelerin morfolojik açıdan ve DNA bütünlüğü açısından, SU'a üstünlüğünü gösteren yayınlar olsa da, bu iki temel metodun benzer sperm seçme kapasitelerine sahip olduğu öne sürülmektedir.<sup>[6,31]</sup> Bu yöntem ile de SU'da olduğu gibi hareketli ve temiz sperm fraksiyonu elde edilebildiğinden tüm YÜT için kullanımı uygundur. Özellikle sperm yoğunluğu çok düşük olan hastalar ve testis dokusundan sperm elde edilmesi için farklı modifikasyonlar yapılarak kullanılabilir. Genel olarak lökositler, eritrositler, lenfositler, küçük yuvarlak spermatidler ve mikrobiyolojik ajanların (HBV, HCV, HIV) kısmen uzaklaştırılması mümkün olabilmektedir. Bununla birlikte, santrifüjden dolayı serbest radikal oluşumu ve akrozomal bölgede hasar oluşabilmektedir. Ayrıca bazı durumlarda zayıf hareketliliği olan testis spermının motilitesinin azalması ya da tamamen kaybı ile karşılaşılabilir.

Sperm hazırlık yöntemlerine göre, DNA fragmentasyon oranlarının kıyaslandığı bir çalışmada, sperm ayırma tekniklerinden; DG ve SU yöntemlerinde fragmentasyon oranlarının benzer olduğu, fakat sperm sayısının çok az olduğu non-obstrüktif azoosperm ve çok ağır OAT olgularında DG+SU yöntemi kombine olarak kullanıldığında fragmentasyon oranının daha düşük olduğu tesbit edilmiştir.<sup>[32]</sup>

Sperm hazırlığı için kullanılan tekniklerde hala geniş bir değişkenlik bulunmaktadır. Her bir prosedürün potansiyel yararları ve risklerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bahsettiğimiz yöntemlerde sadece spermeler



Şekil 7. Yoğunluk gradient yöntemi –dansite gradient (DG).

sedimentasyon ya da migrasyon eğilimlerine göre ayrılarak, morfoloji ve motilite kriterlerine göre seçimleri gerçekleştirilmektedir. Klasik yöntemler fizyolojik değildir, kadın genital ortamında gerçekleşen sperm seçme süreçleri ile uygunluk göstermemektedir. Sperm apoptoz ve benzeri belirtileri, DNA bütünlüğü, membran maturasyonu, foksiyonel mitokondri durumu ve ultra yapısı gibi sperm diğer karakteristik özellikleri tespit edilememektedir. Bu noktada gelişmiş sperm seçim yöntemlerinin kullanılmasına yoğun olarak ihtiyaç duyulmuş ve yeni yöntemler geliştirilmiştir. Burada asıl amaç; yöntemlerin gebelik ya da yardımcı üreme tekniklerinin başarısını arttırmaktan ziyade epigenetik olarak normal sağlıklı nesillerin elde edilmesini sağlaması gerekmektedir. Son yıllarda konu ile ilgili bir çok yöntem geliştirilmiştir. En başarılı sonuçların alındığı yöntemleri gruplandırarak olursak: sperm yüzey yüküne bağlı seçim, apoptoz özelliğine göre seçim, hyaluronik aside bağlanma, sperm morfolojik olarak değerlendirilmesi (intrasitoplazmik morfolojik seçilen sperm enjeksiyonu-IMSI), çift kırılımlının değerlendirilmesi ve DNA bütünlüğü ile oksidatif stresin değerlendirilmesi (mikroakışkan kanal sistemleri –spermchip) gibi yöntemler sayılabilmektedir.

### Manyetik Hücre Ayırıştırma-(Magnetic Activated Cell Sorting- MACS)

Apoptotik olmayan spermelerin seçilmesi sağlanır. Sperm membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin dışa doğru yerleşimi, erken apoptozisin bir göstergesidir. Yöntemde; Annexin-V antikorunun, apoptozun erken belirteçlerinden olan, hücre zarının dış yüzüne yerleşen

fosfatidilserine olan afinitesi temel alınarak geliştirilmiş bir yöntemdir.<sup>[33]</sup> Teknik; basit, hızlı ve yüksek spesifiteye sahiptir. Bununla birlikte, özel ekipmana ihtiyaç duyulmaktadır. Lökosit ve immatür germ hücrelerinin eliminasyonunu sağlamak için DG yöntemiyle birlikte uygulanması önerilmektedir. DG+MACS tekrarlayan santrifüj ve resüpsansiyon basamakları içerdiğinden, uygulamayı takiben sayı ve hareketlilikte düşüş izlenebilmektedir. Ayrıca kullanılan mikrobeadler işlem sırasında parçalanarak ve hücre canlılığı olumsuz etkileyebilmektedir. Bu durumunun önüne geçmek için glass wool (GW) kullanılmaktadır.<sup>[34]</sup> DG+MACS uygulanan kontrollü randomize bir çalışmada fertilizasyon oranlarında anlamlı bir artış izlenmemekle birlikte, gebelik oranları istatistiksel anlamlı olarak artmış (%48 ve %37) bulunmuştur.<sup>[35]</sup> MACS+ SU/DG yapıldığında da sperm kalitesine anlamlı ölçüde bir fayda sağlamadığı, aksine ileri hareketli sperm sayısında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Bu açıdan rutin sperm hazırlığında kullanımı kısıtlı bir yöntemdir.<sup>[36,37]</sup>

### Hyaluronik Asite Bağlanma Kapasitesine Göre Seçim (HA Bağlanma Testi)

Sperm plazma membranında hyaluronik asit (HA) bağlanma bölgesinin oluşu, sperm maturitesinin en önemli işaretlerindedir, seçim bu özelliğe dayanılarak yapılmaktadır.<sup>[38,39]</sup> Günümüzde yöntem iki şekilde uygulanmaktadır. HA'ın sabitlendiği işaretli kuyucukların olduğu PICSİ “fizyolojik intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu” ya da SpermSlow adı verilen HA içeren visköz bir medium ile uygun yavaşlatılmış spermeler seçilmektedir. Bu metodun, yüksek spesifitesi ve minimal güvenlik endişesi vardır, çünkü HA fizyolojik

ortamda yer almaktadır. DNA bütünlüğü iyi, matur, düşük DNA fragmantasyon ve caspase-3 aktivitesi düşük olan spermelerin seçimine imkan vermektedir.<sup>[40,41]</sup> Fakat sperm bağlanmasından önce hazırlama aşamalarında biraz fazla zamana ihtiyaç duyulmaktadır, işlem 30 dk kadar sürebilmektedir. Enjeksiyon yapılacak oosit sayısı fazla olduğunda sorun olabilmektedir. Son Cochrane verisinde ise, HA bağlanması ile seçilen spermelerin ART'de canlı doğum veya gebelik sonuçlarını iyileştirip iyileştiremediği ile ilgili yeterli çalışmanın olmadığı sonucuna varılmıştır.<sup>[37,42]</sup>

## İntrasitoplazmik Morfolojik Seçilen Sperm Enjeksiyonu-IMSI

Çok büyük büyütme altında (X8000-X6300) gerçek-zamanlı olarak motil sperm organel morfolojinin ayrıntılı incelemesi (MSOME) ile normal sperm seçiminin yapılıp, sonrasında ICSI'nin gerçekleştirilmesidir. Sperm başında iri vakuollerin varlığında ya da globozoospermide akrozomal komponentler gibi spesifik sperm organellerin belirlenmesi durumlarında faydalı bir yöntemdir.<sup>[43,44]</sup> ICSI sırasında anlık olarak sperm seçimine imkan vermektedir. Bununla birlikte IMSI için kullanılan MSOME, uzun ve karmaşık bir işlemdir. Bu işlem için özel bir cihaza ihtiyaç duyulmakta olup maliyetlidir. Ayrıca sperm ultramorfolojisinin sınıflandırılmasını yapan kişinin eğitimi ve tecrübesi oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda gebelik ve canlı doğum oranlarının yüksek<sup>[45]</sup>, düşük oranlarının azalmış<sup>[46]</sup>, doğan çocuklarda sağlıkla ilgili risklerinin azalmış<sup>[47]</sup> olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, fertilizasyon, bölünme ve embriyo morfolojisinde bir farklılığın bulunmadığı<sup>[48,49]</sup> ve yine tekrarlayan ART başarısızlığında uygulandığında da implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında bir farklılık olmadığı belirtilmektedir.<sup>[37,50]</sup>

## Sperm Çift Kırılımının (Birefringence) Belirlenmesi

Spermde yer alan boyuna yerleşmiş olan (longitudinal) subakrozomal protein mikofilamentlerin varlığına göre matur formu belirlenmektedir.<sup>[51]</sup> Sperm motilite ya da canlılığı olumsuz etkilenmeden ICSI sırasında reaktif akrozomlu sperm seçilmesi mümkün olmaktadır. Sperm çift kırılımının değerlendirilerek yapılan mikroenjeksiyon yöntemi ile normal ICSI'nin kıyaslandığı ağır erkek faktörlü hastalarda yüksek gebelik oranı ve azalmış düşük oranı gözlenmiştir.<sup>[52]</sup> Fakat yine IMSI'de de olduğu gibi, polarize mikroskopi ile sperm seçimi sırasında da ek ekipman, zaman ve teknik deneyime ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>[37]</sup>

## Mikroakışkan Kanal Sistemleri –Spermçip

Spermilerin belli bir akışkan sistem içinde, mikrokanallar boyunca, gradiente karşı hareket ederek seçilmesini sağlayan sistemlerdir. Sperm DNA fragmantasyonunun, SU ve DG'ye göre daha başarılı şekilde elimine edilebildiği gösterilmiştir<sup>[53]</sup>. Bu noktadan yola çıkarak geleneksel hazırlık yöntemlerinde ortaya çıkan sperm kayıpları ve DNA hasarının önüne geçebilmek için mikroakışkan kanal sistemleri geliştirilmiştir, ancak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>[37]</sup>

Sonuç olarak; yeni çalışmalarla ilgili net bir bilgi mevcut olmamakla birlikte merkezler her zaman kendi laboratuvar şartlarına uygun, en az karmaşık olan ve en iyi sonucu veren, maliyeti düşük yöntemi uygulamaya gayret etmelidir. Bu metodların bazıları yaygın kullanılabilirlikle birlikte, bazılarının sadece belirli hasta gruplarında tercih edilmesi gereklidir. Metod seçiminin bu doğrultuda yapılması halinde ART sonuçlarında genel bir iyileşme sağlanabilmesi mümkün olabilecektir. Fonksiyonel olarak yetkin spermelerin seçiminde optimal verimini elde etmek için mevcut yöntemlerin hiçbiri bu gerekliliklerin çoğunluğunu karşılamadığından, klinik uygulamada çeşitli sperm ayırma tekniklerinin tek ya da birlikte kullanılması zorunluluğu doğmuştur. Sperm hazırlama metodlarının sistematik değerlendirilmesinde en iyi metodu seçmek için daha fazla randomize kontrollü çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

### Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız

### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmişlerdir.

### Finansal Destek

Herhangi bir mali destek alınmamıştır.

### Peer-review

Externally peer-reviewed.

### Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

### Financial Disclosure

No financial disclosure was received.

## KAYNAKLAR

1. Kaupp UB, Kashikar ND, Weyand I. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu Rev Physiol* 2008;70:93–117. [CrossRef]
2. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspect sandapplication of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* 2012;14:260–9. [CrossRef]
3. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. 2010. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf?sequence=1)
4. Li Z, Zhou Y, Liu R, Lin H, Liu W, Xiao W, Lin Q. Effects of semen processing on the generation of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential of human spermatozoa. *Andrologia* 2012;44:157–63. [CrossRef]



5. Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J Androl* 2010;12:753–9. [CrossRef]
6. Xue X, Wang WS, Shi JZ, Zhang SL, Zhao WQ, Shi WH, et al. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1161–6. [CrossRef]
7. Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, et al. Efficacy of super ovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. *N Engl J Med* 1999;340:177–83. [CrossRef]
8. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and males ubfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 2000;355:13–8. [CrossRef]
9. Zhao Y, Vlahos N, Wyncott D, Petrella C, Garcia J, Zacur H, Wallach EE. Impact of semen characteristics on the success of intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:143–8. [CrossRef]
10. Bendsdorp AJ, Cohlen BJ, Heineman MJ, Vandekerckhove P. Intrauterine insemination for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;18:CD000360. [CrossRef]
11. The ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update* 2009;15:265–77. [CrossRef]
12. Ombelet W, Dhont N, Thijssen A, Bosmans E, Kruger T. Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2014;28:300–9. [CrossRef]
13. Badawy A, Elnashar A, Eltongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2009;91:777–81. [CrossRef]
14. Soares JB, Glina S, Antunes N Jr, Wonchockier R, Galuppo AG, Mizrahi FE. Sperm tail flexibility test: a simple test for selecting viable spermatozoa for intra cytoplasmic sperm injection from semen samples without motile spermatozoa. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2003;58:250–3. [CrossRef]
15. De Oliveira NM, Vaca Sanchez R, Rodriguez Fiesta S, Lopez Salgado T, Rodriguez R, Bethencourt JC, Zamora RB. Pregnancy with frozen-thawed and fresh testicular biopsy after motile and immotile sperm microinjection, using the mechanical touch technique to assess viability. *Hum Reprod* 2004;19:262–5. [CrossRef]
16. Ortega C, Verheyen G, Raick D, Camus M, Devroey P, Tournaye H. Absolute asthenozoospermia and ICSI. what are the options? *Hum Reprod Update* 2011;17:684–92. [CrossRef]
17. Francavilla S, Bianco MA, Cordeschi G, D'Abrizio 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;16:1440–8. [CrossRef]
18. Chemes HE, Sedo CA. Tales of the tail and sperm headaches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathology affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012;14:14–23. [CrossRef]
19. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;9:405–28. [CrossRef]
20. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K, Sözen E, Can B, et al. Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:726–30. [CrossRef]
21. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 2002;17:1292–8. [CrossRef]
22. Guichaoua MR, Geoffroy-Siraudin C, Mercier G, Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Metzler-Guillemain C. Genetic aspects of the teratozoospermia. *Gynecol Obstet Fertil* 2009;37:540–5. [CrossRef]
23. Yuan S, Stratton CJ, Bao J, Zheng H, Bhetwal BP, Yanagimachi R, Yan W. Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head-tail junction. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:E430–9. [CrossRef]
24. Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, BrugoOlmedo S, Zanchetti F, Hermes R. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment. A human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod* 1999;14:1811–8. [CrossRef]
25. Hewitson L, Simerly C, Schatten G. Inheritance defects of the sperm centrosome in humans and its possible role in male infertility. *Int J Androl* 1997;20 Suppl 3:35–43.
26. Fetic S, Yeung CH, Sonntag B, Nieschlag E, Cooper TG. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl* 2006;27:294–301. [CrossRef]
27. 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;10:92. [CrossRef]
28. Rawe VY, Hermes R, Nodar FN, Fisz bajn G, Chemes HE. Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondria and severe asthenoteratozoospermia. *Fertil Steril* 2007;88:649–53. [CrossRef]
29. Luppi S, Martinelli M, Giacomini E, Giolo E, Zito G, Garcia RC, Ricci G. Comparative proteomic analysis of spermatozoa isolated by swim-up or density gradient centrifugation. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:36. [CrossRef]
30. World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen - Cervical Mucus Interaction, 4th ed. Cambridge University Press; 1999. <https://www.aab.org/images/WHO%204th%20manual.pdf>
31. Jayaraman V, Upadhyay D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:557–63. [CrossRef]
32. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC, Smith GD. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010;94:2626–30. [CrossRef]
33. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2:127–33. [CrossRef]
34. 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;29:134–42. [CrossRef]
35. Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:375–81. [CrossRef]
36. Cakar Z, Cetinkaya B, Aras D, Koca B, Ozkavukcu S, Kaplanoglu I, et al. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2016;33:1059–65. [CrossRef]
37. Bulgurcuoğlu Kuran S, Altun A. Kaliteli sperm seçiminde güncel yöntemler *Androloji Bul* 2015;17:206–13. [http://www.journalagent.com/androloji/pdfs/AND\\_17\\_62\\_206\\_213.pdf](http://www.journalagent.com/androloji/pdfs/AND_17_62_206_213.pdf)
38. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665–73. [CrossRef]
39. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14:650–63. [CrossRef]
40. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalaei M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:197–203. [CrossRef]
41. 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;19:35–43. [CrossRef]
42. McDowell S, Kroon B, Ford E, Hook Y, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;CD010461. [CrossRef]

43. 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. [\[CrossRef\]](#)
44. 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;34:111–2.
45. Shalom-Paz E, Anabusi S, Michaeli M, Karchovsky-Shoshan E, Rothfarb N, Shavit T, Ellenbogen A. Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) technique improve outcome in patients with repeated IVF-ICSI failure? A comparative study. *Gynecol Endocrinol* 2015;31:247–51. [\[CrossRef\]](#)
46. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006;21:1787–90. [\[CrossRef\]](#)
47. Cassuto NG, Hazout A, Bouret D, Balet R, Larue L, Benifla JL, Viot G. Low birth defects by deselecting abnormal spermatozoa before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2014;28:47–53. [\[CrossRef\]](#)
48. 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;16:835–41. [\[CrossRef\]](#)
49. 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;150:42–6. [\[CrossRef\]](#)
50. Gatimel N, Parinaud J, Leandri RD. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:349–55. [\[CrossRef\]](#)
51. Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;36:333–9.
52. 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;90:104–12. [\[CrossRef\]](#)
53. Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K, Miyamoto S. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil Steril* 2016;105:315–21.e1. [\[CrossRef\]](#)