

İn Vitro Fertilizasyon ve İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu İçin Hyaluronik Asit'e Bağlanma İle Sperm Seçme Tekniği

Artay YAGCI¹

Geliş Tarihi: 24.05.2013
Kabul Tarihi: 06.09.2013

Özet: İn vitro fertilizasyon (IVF) ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için kullanılan sperm kalitesi, bu teknikler ile kaliteli embriyo üretiminin başarı oranını büyük oranda arttırmaktadır. ICSI operatörü tarafından sadece morfolojiye dayalı seçilen sperm, anormal kromozomlu embriyo gelişimine, yüksek oranda aborta ve ciddi gelişim riskine yol açabilmektedir. Spermin hyaluronik asit'e (HA) bağlanması ile sperm olgunluğunu ve fonksiyonunu değerlendiren yeni bir teknik geliştirilmiştir. İn vitro olarak hyaluronik aside bağlanan sperm, düşük anöploidi ve apoptozis gösteren, normal morfolojiye sahip canlı ve olgun spermlerdir. HA ile seçilen sperm ile fertilizasyon, implantasyon, gebelik oranı ve embriyo kalitesi artmaktadır. Spermin HA'ya bağlanması, erkek infertilitesinin klinik tanısında, rutin semen analizi, IVF ve ICSI için yararlı bir şekilde kullanılabilir. Sonuçta üstün niteliklere sahip ırklarda HA'ya bağlanarak seçilen olgun ve DNA bütünlüğüne sahip sperm ile IVF ve ICSI yöntemleri geliştirilebilir ve kaliteli embriyo üretilebilir.

Anahtar Kelimeler: Hyaluronik asit sperm seleksiyonu, sperm matüritesi, fertilizasyon, ICSI.

Hyaluronic Acid Binding Sperm Selection Method for In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection

Abstract: Quality of sperm used for in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) increases success rate of good quality embryo production. Sperm selected only on the basis of morphology by ICSI operator leads to embryo development with anormal chromosome, high rate of abort and serious development risk. New method evaluating maturation and function of sperm with the sperm bind to hyaluronic acid (HA), was developed. Sperms binding to HA have normal morphology, low rate of aneuploidy and apoptosis, and are live and mature. Fertilization, implantation and rate of pregnancy and good embryo quality are increasing with sperm selected with HA. Binding sperm to HA can be used for routine semen analysis, IVF and ICSI in clinical diagnosis of male infertility. In conclusion, IVF and ICSI techniques can be improved with sperms selected by binding to HA and which is mature and has DNA integrity

Key Words: Hyaluronic acid sperm selection, sperm maturity, fertilization, ICSI.

¹ Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Ahmet Necdet Sezer Kampüsü, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye, artay@aku.edu.tr

Giriş

Veteriner hekimlikte embriyo transferinin ana amacı, üstün niteliklere sahip ırklardan ya da hayvansal üretim endüstrisinde az bulunan hayvanlardan fazla sayıda ve değerli embriyo elde etmektir. İnfertilite problemlerinde embriyo üretiminde; suni tohumlama, in vitro fertilizasyon (IVF), subzonal sperm enjeksiyonu (SUZI), intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi yardımcı üreme teknikleri (YÜT) kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden özellikle ICSI son yıllarda çok sık kullanılmaktadır²³.

İntra Stoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI; spermın direkt ovositin sitoplazması içine mekanik olarak yerleştirildiği bir metottür. ICSI yöntemi, ilk olarak hamster⁴⁷, daha sonra fare²⁴, domuz²⁹ ve sığır¹¹ embriyolarının in vitro üretiminde kullanılmış ve günümüzde de kullanımı devam etmektedir. ICSI enjeksiyonu için kullanılan spermın kalitesi in vitro embriyo üretiminin başarı oranını büyük oranda arttırmaktadır.

ICSI İçin Geleneksel Yöntemle Sperm Seçiminin Dezavantajları

Spermın yetersiz konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi kusurlu embriyo üretimine neden olabilmektedir^{6,46}. ICSI için sperm, morfoloji ve motilite baz alınarak seçilir, normal haploid kromozomlu ve DNA bütünlüğüne sahip spermın ayrımı yapılamaz^{4,55}. Sadece morfolojiye dayalı seçilmiş olan sperm, gelişim riskine, anormal kromozomlu embriyo gelişimine, düşük gebeliğe ve yüksek oranda aborta yol açmaktadır⁸. Bununla birlikte ICSI ile, kromozomal olarak hasarlı bir spermın seçilerek enjekte edilme riski artmaktadır³⁴. Hayvanlarda ICSI yönteminde DNA hasarlı spermın enjeksiyonu ile gebelik ve doğumda oluşan olumsuz etkiler yanında, erişkin hayvanlarda da, mesenşimal tümör, anormal davranışlar ve dengesiz gelişme gibi yan etkiler belirlenmiştir¹⁰. Yapılan IVF ve ICSI çalışmasında hasarlı DNA'ya sahip bir spermın, gebeliğin kaybı ile pozitif yönde korelasyon gösterdiği istatistik olarak ortaya konmuştur⁵⁷. Bunun yanında ICSI prosedüründe spermıleri yavaşlatmak için kullanılan polivinylpyrrolidone (PVP) medyumunun gamet ve gelişen embriyo için toksik olduğu ve yeni bir sperm seçme tekniğinin gerekliliği bildirilmektedir²¹. Ayrıca sperm konsantrasyonuna, motilitesine ve morfolojisine göre yapılan geleneksel semen analizi erkek fertilitasını değerlendirme-

de yaygın olarak kullanılmasına karşın, elde edilen sonuçlar in vivo ve in vitro fertilitenin prognozu, spermın ovosite bağlanma yeteneği, nükleer olgunluk ve DNA'nın normal olması gibi spermın fonksiyonel özelliklerini belirleyememekte, sperm hakkında tam bir diagnostik ve prognostik bir bilgi vermemektedir^{1,2,16,27,50}. Bu sebeplerden dolayı ICSI ile bağlantılı riskleri minimize etmek ve membran olgunluğuna ulaşmış normal sperm seçimi için yeni tekniklerin kullanımı gereklidir^{2,37}.

Sperm Yüzey Markerleri; CK-B ve HspA2

Dr. Huszar ve arkadaşları olgun ve kromozomal hasara sahip olmayan iyi bir spermı seçecek biyokimsal belirteçler bulabilmek için sperm yüzey markerleri üzerinde bir dizi araştırmalar yapmışlardır. Semenlerinde, yüksek kreatin fosfokinaz B (CK-B) isoformu bulunan erkeklerin fertilité şansının düşük olduğunu¹⁴, spermiyogenezin son evrelerinde gerçekleşmesi gereken fazla sitoplazmanın atılımının doğru şekilde gerçekleşmediği durumlarla (sitoplazmik tutulum), spermın yüksek CK-B aktivitesine, azalmış bir olgunluk ve fonksiyona sahip olduğunu belirlemişlerdir^{12,16}. Bu bilgiler ışığında sitoplazmik tutulumla sahip olgun olmayan spermın, zona pellusidaya yetersiz bağlanma gösterdiği bildirilmiştir¹⁶. Bununla birlikte sperm oluşum sürecinde olgun spermde DNA bütünlüğüyle bağlantılı Heat-shock A2 (HspA2) proteini eksprese olmakta ve oluşan kromozomal anomalilerin HspA2'nin düşük ekspresyonu ve mayotik kusurlarla ilişkili olduğu vurgulanmıştır^{1,7,15}.

Spermın Hyaluronik Asit'e (HA) Bağlanması: Olgun Sperm Belirteci

Ovositler; kalın bir glikoprotein tabaka olan zona pellusida ve korona radiata hücreleri ile sarılmıştır. Ovosit membranına yapışmadan önce spermın bu iki katmanı geçmek zorundadır. HA, reproduktif sistemde kumulus ovoforus kompleksi, seminal sıvı ve ovidukt sıvısından salgılanmaktadır⁴⁴. Medyuma hyaluronik asidin eklenmesinin taze ejakulatın ve dondurulmuş çözdürülmüş insan spermının canlılığını, motilitesini ve hızını arttırdığı belirlenmiştir^{13,42,54}.

Spermatogenez sırasında, HA bağlanma ve zona pellusidaya bağlanma yerlerinin şekillenmesi, sitoplazma fazlalıklarının atılması ve nükleer histon-protamin değişiminin olması süreçlerini takiben spermın plazma membranı yeniden şekillenmiş olur¹⁶. Böylece, HA'ya bağlanan olgun spermde, sperm baş kısmı üye-

rinde plasma membran HA reseptörü oluşur. İn vitro olarak spermin HA'ya bağlanması, erkek fertilitesiyle bağlantılı olan sperm olgunluğunun, canlılığının ve akrozomal durumunun iyi olduğunu gösteren bir belirteç olduğu bildirilmektedir¹⁶. Bundan dolayı olgun bir sperm hyalüronik aside, spermin zona pellüsida bağlanması gibi yüksek seçicilikle bağlanabilmektedir²⁸. Olgunluğa erişmeyen spermelerde HA bağlanma bölgesi yoktur ve bunun eksikliği kromozomal sapmaların sıklığının artmasıyla orantılıdır¹⁹. Spermin HA'ya bağlanması; sperm olgunlaşmasının^{2,16}, nükleer¹⁹ ve sitoplazmik bütünlüğün^{14,41} artması anlamına gelmektedir. HA bağlanma bölgesi oluşmayan spermelerin IVF tekniği kullanılsa bile ovositi dölleme yeteneği yoktur³⁶. HA'ya bağlanan spermelerin normal morfoloji ve yüksek HspA2 aktivitesi, düşük oranlarda anöploidi ve caspase-3 aktivitesi gösterirken, DNA fragmantasyonu ve CK-B aktivitesini göstermediği belirlenmiştir^{3,16,17,19,26}.

Sperm-Hyaluronik Asit Bağlanma Tesiti

Bu test, sağlam kromozom yapısına sahip ve iyi morfolojideki spermelerin HA tarafından seçici bir şekilde bağlanması esasına dayanmaktadır. Olgun spermelerin HA'ya bağlanarak uzun süre hareketli kaldığı ve hareketin arttığı bildirilmektedir¹⁶. Bu bilgiler ışığında Dr. Huszar ve arkadaşları tarafından IVF için insan sperm olgunluğunu ve fonksiyonunu değerlendiren hyaluronan kaplı slaytlar içeren HBA (Sperm-hyaluronan-binding assay) test (Biocoat INC. Fort Washington, PA) geliştirilmiştir^{1,2,16}. Bu test bir tarafı kaplanmamış (A odacığı), diğer tarafı (B odacığı) ise katı formda HA ile kaplanmış slaytlar içermektedir. A odacığında sadece semen örneğindeki hareketli sperm sayısı hesaplanmakta, B odacığında ise HA'ya bağlanan sperm yüzdesi belirlenmektedir. Bu amaçla 7 µl PBS ile yıkanmış semen HA yüzeyinde oda ısısında 5-10 dk. inkübe edilmektedir¹⁶.

HBA slaytlarının A ve B kısımlarındaki spermelerin morfolojileri değerlendirildiğinde ise HA'ya bağlanan spermelerde Tygerberg kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm oranının, semedeki spermere göre 3 kat daha fazla oranda (%95) olduğu gösterilmiştir⁴⁰. Yapılan bir çalışmada ise HBA testi kullanılarak spermelerin HA'ya bağlanması ile anti sperm antikorlarının spermere bağlanması arasında negatif korelasyon olduğu ve bu negatif korelasyona göre immunolojik infertilitenin diagnozu hakkında bilgi sahibi olunabileceği bildirilmiştir⁵³. Sonuçta HBA testinin erkek infertilite-

sinin klinik diagnozunda rutin semen analizi, IVF ve ICSI için yararlı bir şekilde kullanılabilirliği rapor edilmiştir².

Fizyolojik ICSI; ICSI İçin HA ile Sperm Seçme Tekniği

IVF laboratuvarlarında HA içeren sıvı medyumlar hazırlanarak kullanılabilirliği gibi, ICSI uygulamaları için yine Dr. Huszar ve arkadaşları tarafından "PICSI" (preselected intracytoplasmatic sperm injection) adı verilen HA kaplı petriyeler ticari olarak geliştirilmiştir (PICSI® Sperm Selection Device, Midatlantic Scientific, Mount Laurel, NJ, USA). ICSI için HA'ya bağlanarak sperm seçme yöntemi "Fizyolojik ICSI" olarak tanımlanmıştır³⁷.

PICSI Prosedürü

Steril PICSI petriyeri; ICSI uygulamaları için 3 adet 100 mikron çapında HA ile kaplanmış mikronoktalar ile geliştirilen polystrene kültür petriyelerinden oluşur. PICSI petriyeri mineral yağ altında inkübasyona bırakılır ve 15 dk içinde spermeler baş kısımlarıyla HA ile kaplı mikronoktalara bağlanarak hızlı kuyruk hareketleriyle baş bölgesi etrafında dönerler. ICSI için en hareketli olarak bağlanan spermeler enjeksiyon pipeti kullanılarak toplanır ve tek tek ovosit içine enjekte edilir¹⁹.

HA içeren ürünlerin enjeksiyon sonrası zigot gelişmesine hiçbir olumsuz etkisi olmadığı ve ovosit tarafından HA'nın metabolize edildiği bildirilmiştir⁴⁸. PICSI'ler ICSI için kromozomal anomaliler bakımından düşük frekansa sahip, olgun ve normal kromozomal yapıya sahip bir sperm seçimini kolaylaştırmaktadır¹⁶. Akridin Oranj Flöresan yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, semen örneklerinde DNA bütünlüğünün % 54.9 olduğu, buna karşın PICSI petriyelerde HA'ya bağlanan spermelerin % 99.1 gibi çok yüksek oranda sağlam DNA bütünlüğüne sahip oldukları gösterilmiştir⁵⁵. Yine FISH yöntemi kullanılarak HA ile seçilen spermeler incelendiğinde oligospermik ve normospermik popülasyonlarda anoploid ve diploid spermelerin elimine edildiği gösterilmiştir¹⁹. Sonuçta HA ile sperm seçimi öncelikle ICSI kullanımı için genetik ve DNA bütünlüğü olarak gelişmiş bir sperm seçilmesi anlamına gelmekte ve ICSI için potansiyel olan kalıtsal riski minimuma indirmektedir^{19,55}.

Klinik Çalışmalarda HA İle Sperm Seçmenin Etkinliği

Ye ve ark.⁵⁶ HBA testini standart semen analizi ile karşılaştırmış ve HBA skoru ile sperm motilitesi, normal morfolojisi ve fertili-

zasyon oranı arasında yüksek oranda korelasyon belirlemişlerdir. Nasr-Esfahani ve ark.³³ yaptıkları çalışmada anormal sperm morfolojisi, DNA fragmentasyonu, protamin eksikliği ile HA bağlanma yüzdesi arasında istatistiki anlamda ters orantı bulmuşlardır. Parmegiani ve ark.³⁷ HA tarafından normal nukleus ve sağlam DNA'ya sahip sperm ile yapılan ICSI (HA-ICSI) ile embriyo kalitesi ve gelişim oranının geleneksel PVP-ICSI yöntemine göre istatistiki anlamda düzeldiğini³⁷; yine bir başka çalışmalarında ise fertilizasyon ve gebelik oranlarının iyileştiğini, embriyo kalitesi ve implantasyon oranının istatistiki derecede arttığını, implantasyon oranının PVP-ICSI'de % 10.3, HA-ICSI grubunda ise %17.1 olduğunu göstermişlerdir³⁸. HA'nın genetik hataları azaltması ve toksik etkisinin olmamasından dolayı ICSI öncesi fizyolojik sperm seçiminde ilk tercih olarak düşünülmesi gerektiği bildirilmiştir³⁹. Yine bazı araştırmacılar tarafından HA ile seçilen sperm ile ovositlere enjeksiyon yapıldığında fertilizasyon oranının yüksek olduğu rapor edilmiştir^{20,33}. Worri- low ve ark.⁵¹ benzer klinik sonuçlarla, HA ile seçilen sperm ile embriyo kalitesi ve implantasyon oranının arttırıldığını, erken embriyonik ölümlerin azaldığını belirterek geleneksel ICSI'ye göre PICSİ'nin etkinliğini kanıtlamışlardır. Worri- low ve ark.⁵² yaptıkları son araştırmada ise HA grubunda gebelik oranının arttırıldığını, gebelik kayıplarının ise geleneksel ICSI'ye göre azaldığını (HA grup % 3.3; kontrol grup % 15.1, p=0.21) belirlemişlerdir.

Bu araştırmacıların aksine bazı araştırmacılar ise HA-ICSI'nin fertilizasyon⁴⁸, embriyo kalitesi^{25,30,35,45} ve gebelik oranı³⁰ açısından normal ICSI yöntemine göre bir fark oluşturmadığını ve kullanımının sınırlı olduğunu bildirmektedirler.

Hayvanlarda Klinik Çalışmalarda HA İle Sperm Seçmenin Etkinliği

Domuzlarda medyuma HA eklenmesinin geleneksel IVF süresince polispermi durumunu azalttığı⁴⁴, fertilizasyonda ICSI tekniğinin başarısının, enjeksiyon için seçilen sperm kalitesine bağlı olduğu bildirilmektedir³⁶. Park ve ark.³⁶ yaptıkları çalışmada domuz spermelerinde kromozomal anormallik oranını %6.25 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada domuzlarda PVP grubu ile karşılaştırıldığında HA'ya bağlanarak seçilen sperm ile ICSI etkinliğinin arttırıldığı, HA'ya bağlanarak elde edilen sperm ile yapılan ICSI'de PVP grubuna (68.2%) göre istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek normal diplo-

idi (75.5%) ve çok düşük anöploidi sıklığına sahip embriyo elde edildiği gösterilmiştir. HA ile seçilen sperm ile embriyo transferinde embriyodaki kromozomal hasardan kaynaklanan erken embriyonik ölümlerin engellenebileceği ve embriyo transferinin başarısının artacağı bildirilmiştir³⁶.

HBA ve PICSİ petripleri aygır spermelerinde suni tohumlama ve ICSI amacıyla değerlendirilmiştir. Aygırlarda PICSİ petripleri kullanılarak seçilen sperm ile operatör tarafından sadece normal morfolojik görünümü temel alınarak seçilen sperme göre yüksek oranda blastokist aşamasına gelen yarıklanmış ovosit üretilmiştir³¹. Colleoni ve ark.⁵ aygır spermelerinin HA ile bağlandığını ve PICSİ ile seçilen sperm ile gelişen embriyo ve blastokist oranının arttığını bildirmişlerdir. HBA dondurulmuş aygır spermelerinde kullanılmış ve aygır spermelerinin %11-%24 oranında HA'ya bağlandığı³² bunun da insan spermelerindeki HA'ya bağlanma oranlarından (%28-%89) daha düşük olduğu rapor edilmiştir⁵⁶. Daha düşük olmasının ise deneyde kullanılan ejakulatların ticari bir solüsyon (INRA96; IMV) içinde buzdolabında 1 gece bekletildikleri için spermelerin bazı HA bağlanma bölgelerinin inaktive olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İn vitro üretilen sığır embriyosunda kromozomal anormallik oranı FISH tekniği ile %13- 25 arasında bulunmuştur^{43,49}. Döl tutmayan ineklerde %14.3 oranında kromozom bozukluklarına rastlandığı bildirilmektedir¹⁸. Morfolojik olarak anormal spermelerin sayısının artmasının boğalarda fertilite düşüklüğünün bir göstergesi olduğu²², sığır ovositlerinin kromozomal olarak anormal sığır spermeleri ile fertilize edildikleri zaman yarıklanabildiği fakat gelişmenin ilerleyen aşamalarda bloke olduğu gösterilmiştir⁹. Bu tip durumlarda embriyolog tarafından PICSİ petriplerde HA'ya bağlanan olgun ve DNA bütünlüğüne sahip sperm seçilmesiyle elde edilen embriyoların kalitelerinin arttırılması sağlanabilecektir.

Sonuç

1- HA ile sperm seçme yöntemi, embriyologlara enjeksiyon için en iyi spermi seçmeye yardımcı olmaktadır.

2- Bu teknik kullanılarak geliştirilen HBA testi erkek infertilitesinin klinik diagnosis, rutin semen analizi, IVF ve ICSI için yararlı bir şekilde kullanılabilir.

3- Son on yılda insan hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaya başlanılan bu tekniğin veteriner hekimlikte de kullanılması hayvan türlerinde embriyo kalitesi, blastokist formasyonu, gebeliğin arttırılması ve abortun azalması gibi parametelerin iyileştirilmesine ve infertilite problemlerinin çözümüne katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Cayli S., Jakab, A., Ovari, L., Delpiano, E., Celik-Ozenci, C., Sakkas, D., Ward, D., Huszar, G., 2003. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online.*, 7, 462-468.
2. Cayli S., Sakkas, D., Vigue, L., Demir, R., Huszar, G., 2004. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-xl levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod.*, 10, 365-372.
3. Celik-Ozenci C., Catalanotti, J., Jakab, A., Aksu, C., Ward, D., Bray-Ward P., Demir, R., Huszar, G., 2003. Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Biol Reprod.*, 69 (4), 1347-55.
4. Celik-Ozenci C., Jakab, A., Kovacs, T., Catalanotti, J., Demir, R., Bray-Ward P., et al., 2004. Sperm selection based on shape properties alone does not preclude the presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod.*, 19, 2052-9.
5. Colleoni S., Lagutina, I., Lazzari, G., Rodriguez-Martinez, H., Galli, C., Morrell, J.M., 2011. New methods for selecting stallion spermatozoa for assisted reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science.*, 31 (9), 536-541.
6. Connell MO., McClure, N., Lewis, S.E.M., 2002. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. *Hum Reprod.*, 17, 1565-70.
7. Eddy EM., 1994. Role of heat shock protein Hsp70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod.*, 4, 23-30.
8. Edirisinghe W.R., Murch, A., Junk, S., Yovich, J., 1997. Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double-blind study. *Hum Reprod.*, 12, 2784-91.
9. Fatehi A.N., Bevers, M.M., Schoevers, E., Roelen, B.A.J., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology.*, 27 (2), 176-188.
10. Fernandez-Gonzalez R., Moreira, P.N., Perez-Crespo, M., Sanchez-Martin, M., Ramirez, M.A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Alvarez, P., de Dios, H.J., De Fonseca, F.R., Gutiérrez-Adán, A., 2008. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod.*, 78, 761-772.
11. Hamano K., Li, X., Qian, X.Q., Funachi, K., Furudate, M., Yoshiaki, M., 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol Reprod.*, 60, 1194-7.
12. Huszar G., and Vigue, L., 1993. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev.*, 34 (3), 292-8.
13. Huszar G., Willets, M., Corrales, M., 1990. Hyaluronic acid (sperm select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril.*, 54, 1127-34.
14. Huszar G., Sbracia, M., Vigue, L., Miller, D.J., Shur, B.D., 1997. 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.*, 56 (4), 1020-4.
15. Huszar G., Stone, K., Dix, D., Vigue, L., 2000. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod.*, 63, 925-932.
16. Huszar G., Ozenci, C.C., Cayli, S., Zavaczki, Z., Hansch, E., Vigue, L., 2003. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.*, 79 (3), 1616-24.
17. Huszar G., Jakab, A., Sakkas, D., Celik-Ozenci, C., Cayli, S., Delpiano, E., Ozkavukcu, S., 2007. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online.*, 14, 650-63.
18. İleri K., Ak, K., Pabuççuoğlu, S., Usta, S., 1998. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniv. Vet. Fak. yayınları 84, 139-145.
19. Jakab A., Sakkas, D., Delpiano, E., Cayli, S., Kovanci, E., Ward, D., Revelli, A., Huszar, G., 2005. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril.*, 84, 1665-73.
20. Janssens R., Verheyen, G., Bocken, G., et al., 2006. Use of PICSI dishes for sperm selection in clinical ICSI practice: results of a pilot study. Abstract. *Annual Meeting of the Belgian Society Reproductive Medicine.*

21. Jean M., Mirallié, S., Boudineau, M., Tatin, C., Barrière, P., 2001. Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk. *Fertil Steril.*, 76, 419-20.
22. Kaya A., 1999. Boğalarda Anormal Spermatozoonların Oluşum Nedenleri ve Sınıflandırılması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.*, 5 (2), 215-222.
23. Keller D.L., 2001. Oocyte activation and sperm lyophilization: implications for intracytoplasmic sperm injection in the bovine. (PhD), Texas A&M University, Department of Veterinary Physiology.
24. Kimura Y., Yanagimachi, R., 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod.*, 52, 709-20.
25. Kovacs P., Kovacs, T., Sajgo, A., Szollosi, J., Matyas, S., Kaali, S.G., 2011. The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet.*, 28 (1): 49-54.
26. Kovanci E., Kovacs, T., Moretti, E., Vigue, L., Bray-Ward, P., Ward, D.C., Huszar, G., 2001. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod.*, 16 (6), 1209-17.
27. Liu D.Y., and Baker, H.W.G., 1992. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril.*, 58, 1178-1184.
28. Liu D.Y., Garrett, C., Baker, H.W.G., 2003. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod.*, 18, 2382-9.
29. Martin M., 2000. Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.*, 63, 109-12.
30. Menezo, Y., Junca, A.M., Dumont-Hassan, M., De Mouzon, J., Cohen-Bacrie, P., Ben Khalifa, M., 2010. "Physiologic" (hyaluronic acid-carried) icsi results in the same embryo quality and pregnancy rates as with the use of potentially toxic polyvinylpyrrolidone (PVP). *Fertil Steril.*, 94 (1), 232.
31. Morrell J.M., Colleoni, S., Lagutina, I., Rodriguez-Martinez, H., Lazzari, G., Galli, C., 2010a. Stallion spermatozoa selected by Single Layer Centrifugation with AndrocollTM-E have normal functionality after ICSI. *Animal Reproduction Science.*, 121, 196-197.
32. Morrell J.M., Meurling, S., and Rodriguez-Martinez, H., 2010b. "Can the HBA be used predictively for stallion spermatozoa," in *Proceedings of the 11th International Symposium on Spermatology*, Okinawa, Japan.
33. Nasr-Esfahani M.H., Razavi, S., Vahdati, A.A., Fathi, F., Tavalae, M., 2008. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.*, 25, 197-203.
34. Navarro-Costa P., Nogueira, P., Carvalho, M., Leal, F., Cordeiro, I., Calhaz-Jorge, C., Gonçalves, J., Plancha, C.E., 2010. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum Reprod.*, 25, 2647-2654.
35. Nijs M., Creemers, E., Cox, A., Franssen, K., Janssen, M., Vanheusden, E., De Jonge, C., Ombelet, W., 2009. Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online.*, 19, 671-684.
36. Park C.Y., Uhm, S.J., Song, S.J., Kim, K.S., Hong, S.B., Chung, K.S., Park, C., Lee, H.T., 2005. Increase of ICSI efficiency with hyaluronic acid binding sperm for low aneuploidy frequency in pig. *Theriogenology.*, 64, 1158-1169.
37. Parmegiani L., Cognigni, G.E., Bernardi, S., Troilo, E., Ciampaglia, W., Filicori, M., 2010a. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril.*, 93, 598-604.
38. Parmegiani L., Cognigni, G.E., Ciampaglia, W., Pocognoli, P., Marchi, F., Filicori, M., 2010b. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet.*, 27, 13-16.
39. Parmegiani L., Cognigni, G.E., Filicori, M., 2010c. Risks in injecting hyaluronic acid non-bound spermatozoa. *Reprod Biomed Online.*, 20, 437-438.
40. Prinosilova P., Kruger, T., Sati, L., Ozkavukcu, S., Vigue, L., Kovanci, E., Huszar, G., 2009. Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. *Reprod Biomed Online.*, 18 (2), 177-83.
41. Sakkas D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., Bianchi, U., 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.*, 4 (1), 31-7.
42. Sbracia M., Grasso, J., Sayme, N., Stronk, J., Huszar, G., 1997. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 12, 1949-54.
43. Slimane W., Heyman, Y., Lavergne, Y., Humblot, P., Renard, J.P., 2000. Assessing chromosomal abnormalities in two cell bovine in

- vitro-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol Reprod.*, 62, 628-35.
44. Suzuki K., Eriksson, B., Shimizu, H., Nagai, T., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *Int J Androl.*, 23, 13-21.
 45. Tarozzi N., Nadalini, M., Bizzaro, D., Serrao, L., Fava, L., Scaravelli, G., et al., 2009. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online.*, 3, 35-43.
 46. Terada Y., Nakamura, S., Morita, J., Simerly, C., Hewiton, L., Murakami, T., Yaegashi, N., Schateten, G., Okamura, K., 2003. Intrastoplasmic sperm injection: stiletto conception or a stab in the dark. *Arc. of and.*, 49, 169-177.
 47. Uehera T., Yanagimachi, R., 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster egg with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod.*, 15, 467-70.
 48. Van den Bergh, M., Fahy-Deshy, M., Hohl, M.K., 2009. Pronuclear Z-Score is not influenced by the intracytoplasmic injection of Hyaluronan bound spermatozoa: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.*, 19 (6), 796-801.
 49. Viuff, D., Rickords, L., Offenbergh, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, J.L., Callesen, H., Thomson, P.D., 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol Reprod.*, 60, 1273-1278.
 50. World Health Organization., 1999. WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1-20.
 51. Worrilow K.C., Eid, S., Matthews, J., Pelts, E., Khoury, C., Liebermann, J., 2010. Multi-site clinical trial evaluating PICSi, a method for selection of hyaluronan bound sperm (HBS) for use in ICSI: improved clinical outcomes. *Hum Reprod.*, 25 (1), i7.
 52. Worrilow K.C., Eid, S., Woodhouse, D., Perloe, M., Smith, S., Witmyer, J., et al., 2013. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes-multicenter, doubleblinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod.*, 28, 306-14.
 53. Yagci, A., Sanguineti, F., Stronk, J., Bronson, R., Patrizio, P., Huszar, G., 2007. New Insights into Immunological Infertility Testing for Anti-Sperm Antibodies and Sperm-Zona Pellucida Binding Ability by the Immunobead Assay and Sperm-Hyaluronic Acid Interaction. *American Society for Reproductive Medicine*, October 13-17, Washington DC, USA, pp.228.
 54. Yagci, A., Olcali, O., Stronk, J., Murk, W., Huszar, G., 2008. Relationship Between Sperm-Hyaluronic Acid (Ha) Binding Assay Scores And Ha-Mediated Increase In Maintenance Of Sperm Motility And Velocity In Ivf Conditions. *American Society for Reproductive Medicine*, November 8-12, San Francisco, California, USA, pp.323.
 55. Yagci A., Murk, W., Stronk, J., Huszar, G., 2010. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl.*, 31(6), 566-72.
 56. Ye H., Huang, G.N., Gao, Y., de Liu, Y., 2006. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Hum Reprod.*, 21, 1545-50.
 57. Zini A., Boman, J.M., Belzile, E., Ciampi, A., 2008. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reprod.*, 23, 2663-8.

