

GIÁ TRỊ CỦA KỸ THUẬT IMSI TRONG THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM



Ths.Bs VŨ BÍCH THỤY

NỘI DUNG

- 1- Giới thiệu
- 2- Quy trình thực hiện
- 3- Tiêu chuẩn đánh giá hình thái bào quan tinh trùng di động- MSOME
- 4- Hiệu quả lâm sàng- so sánh IMSI và ICSI
- 5- IMSI và một số vấn đề liên quan
 1. Không bào
 2. "Túi thừa" nhiễm sắc chất
 3. TT và khả năng lưỡng chiết quang
 4. IMSI hay PICSI ?
- 6- Một số kết quả ban đầu ứng dụng kỹ thuật IMSI tại BV Từ Dũ
- 7- Ứng dụng của MSOME ngoài IMSI

2

1- GIỚI THIỆU

Chọn TT ở độ phóng đại x 400 lần



Chọn TT ở độ phóng đại x 6600 lần



ICSI cổ điển Palermo 1992
(Intracytoplasmic Sperm Injection)

9% em bé ICSI mang bất thường di truyền nặng (Hansen 2002)

ICSI cải tiến

IMSI = ICSI + MSOME

Intracytoplasmic
Morphologically
Selected
Sperm
Injection

Motile
Sperm
Organellar
Morphological
Examination

Bartoov 2001

ĐỐI TƯỢNG CHỈ ĐỊNH

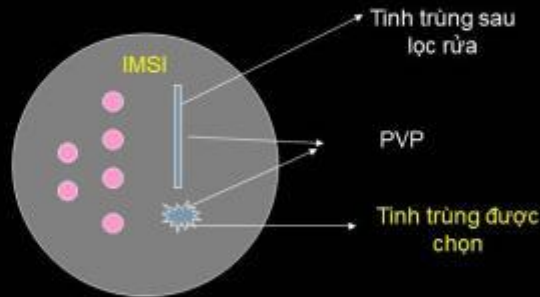
- o Nhóm BN hiếm muộn/vô sinh có nguyên nhân bất thường từ người nam
 - ❖ Tinh trùng ít, yếu, dị dạng nặng
 - ❖ BN phải lấy tinh trùng bằng thủ thuật PESA (chọc hút tinh trùng từ mào tinh) hay TESE (tinh trùng từ mẫu sinh thiết tinh hoàn)
 - ❖ BN có tỷ lệ tinh trùng mang DNA phân mảnh (DNA fragmentation) cao
 - ❖ BN thất bại sau điều trị IVF/ICSI nhiều lần.

4

2- QUY TRÌNH THỰC HIỆN IMSI

CHUẨN BỊ

- ❖ Tinh trùng : phương pháp gradient nồng độ
- ❖ Môi trường



- ❖ Thực hiện đánh giá hình thái các bào quan tinh trùng di động- MSOME- bằng hệ thống IMSI
- ❖ Chích ICSI

2- QUY TRÌNH THỰC HIỆN IMSI

HỆ THỐNG KÍNH HIỂN VI ĐẢO NGƯỢC, VI THẢO TÁC VÀ IMSI



Cần ít nhất 2 người đánh giá

3- TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI BÀO QUAN TINH TRÙNG DI ĐỘNG-MSOME

3- TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI BÀO QUAN TINH TRÙNG DI ĐỘNG-MSOME

Journal of Andrology, Vol. 23, No. 1, January-February 2002
Copyright © American Society of Andrology

Breakthroughs in Andrology

Real-Time Fine Morphology of Motile Human Sperm Cells is Associated With IVF-ICSI Outcome

BENJAMIN BARTOON*, **ARIE BERKOVITZ†**, **FINA ELTES***, **AVRAHAM KOGOSOWSKI‡**, **YVES MENEZO,§** AND **YONA BARAK‡**

From the *Male Fertility Laboratory, Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel; †IVF Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Rabin Medical Center, Petah Tikva, Israel; ‡IVF Unit, Herzliya Medical Center, Herzliya-on-the-Sea, Israel; and §Laboratoire Marcel Merieux, Bron, France.

ABSTRACT: The aim of the present prospective study was to determine whether subtle sperm morphological characteristics affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and if so, to identify those that are relevant. For this purpose, we developed a new method, the motile sperm organelle morphology examination (MSOME). The examination is performed in real time using an inverted light microscope equipped with high-power Nomarski optics enhanced by digital imaging to achieve a magnification up to 6300×. MSOME was applied to the leftover sperm fraction selected for microinjection in 100 random couples referred for ICSI treatment at 3 major in vitro fertilization centers. We found that the morphological normality of the entire sperm cell, according to MSOME criteria, was

positively associated with ICSI fertilization rate (area under the receiver operating characteristics [ROC] curve, 58%) but not with pregnancy outcome. The morphological normality of the sperm nucleus, defined by MSOME, was significantly and positively associated with both fertilization rate and pregnancy outcome (areas under the ROC curve, 72% and 74%, respectively). These findings indicate that ICSI-associated pregnancy rate may be affected by subtle morphological malformations of the sperm nucleus, which may remain undetected by the embryologist during the routine selection procedure. **Key words:** Motile sperm morphology, ICSI fertilization rate, ICSI pregnancy rate.
J Androl 2002;23:1-8

Reproductive Biomedicine Online (2012) 24, 211–216



www.sciencedirect.com
www.rbmonline.com



ARTICLE

Correlation between DNA defect and sperm-head morphology

Nino G Cassuto^{a,*}, **André Hazout^a**, **Ibrahim Hammoud^c**, **Richard Balet^b**, **Dominique Bouret^a**, **Yona Barak^a**, **Sonia Jellad^a**, **Jean Marie Plouchart^a**, **Jacqueline Selva^c**, **Chadi Yazbeck^{d,e}**

^a Art Unit, Drouot Laboratory, 19 Rue Drouot, 75009 Paris, France; ^b Reproductive Medicine Department, Hôpital des Bleuets, 4 Rue Lavoisier, 75012 Paris, France; ^c Reproductive Medicine Department, CHR, 78300 Poissy, France; ^d Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Department, Bichat Claude, Bernard University Paris VII, Paris, France; ^e INSERM Unit 780, Epidemiology and Biostatistics, Villejuif, France
* Corresponding author. E-mail address: g.cassuto@labodrouot.com (N.G. Cassuto).



Nino Guy Cassuto is the head of the Drouot laboratory. Since 1995 he has also led the assisted reproduction units of two hospitals in Paris. His research fields are embryo development and male infertility. He has published national and international articles, particularly concerning sperm morphology. He continues to pursue his interests in early embryo development with a particular emphasis on the role of spermatozoa.

3- TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI BẢO QUAN TINH TRÙNG DI ĐỘNG-MSOME

International Journal of Andrology
International journal of andrology ISSN 0105-0263



ORIGINAL ARTICLE

Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME)

A. Perdrix,* R. Saldi,* J. F. Ménard,† E. Gruel,* J. P. Milazzo,* B. Macé* and N. Rives*

*EA 4308 "Spermatogenesis and male gamete quality", Reproductive Biology Laboratory – CECCOS, and Unité de Biostatistiques, Rouen University Hospital, Rouen Cedex, France

Keywords:
IMSI, MSOME, semen analysis, sperm morphology, sperm nuclear vacuoles

Correspondence:
Prof. Nathalie Rives, EA 4308 "Spermatogenesis and male gamete quality", Reproductive Biology Laboratory – CECCOS, IRRMP23, IRB Rouen Normandie, Rouen University Hospital, 1 rue de Germont, 76031 Rouen cedex, France. E-mail: nathalie.rives@chu-rouen.fr

Received 8 November 2011; revised 23 December 2011; accepted 15 January 2012

doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01249.x

Summary

With the motile sperm organelle morphology examination (MSOME), spermatozoa morphology may be assessed directly on motile spermatozoa at high magnification (up to 6600x). This procedure describes more precisely spermatozoa abnormalities, especially head vacuoles. However, no consensus has been established concerning normal or abnormal MSOME criteria. The aim of our study was to define MSOME vacuole criteria assessed objectively with a digital imaging system software to establish a potential relationship between conventional semen parameters. A total of 440 semen samples were obtained from males consulting in Rouen University Hospital Reproductive Biology Laboratory. Conventional semen analysis (volume, sperm concentration, progressive motility, vitality and morphology) and MSOME assessment (sperm head length, width and area as well as vacuole number, vacuole area and relative vacuole area to sperm head [RVA (%) = [vacuole area (µm²)/head area (µm²) × 100]) were performed for each semen sample. Among our 440 males, 109 presented normal conventional semen parameters and 331 abnormal

4 - HIỆU QUẢ LÀM SÀNG - SO SÁNH IMSI VÀ ICSI

Reproductive Biomedicine Online (2010) 21, 450–455



www.sciencedirect.com
www.rbmonline.com



REVIEW

Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis

Amanda Souza Setti^a, Renata Cristina Ferreira^b, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga^{a,b}, Rita de Cássia Sávio Figueira^{a,b}, Assumpto Iaconelli Jr^b, Edson Borges Jr^{a,b,*}

^a Sapientiae Institute - Educational and Research Center in Assisted Reproduction, R. Vieira Maciel, 62, 04503-040 São Paulo, SP, Brazil; ^b Fertility - Assisted Fertilization Center, Av. Brigadeiro Luís Antônio, 45-45, 1401-002 São Paulo, SP, Brazil

* Corresponding author. E-mail address: edson@fertility.com.br (E. Borges).



Edson Borges Jr obtained his MD degree in 1984 at the University of Campinas, São Paulo, Brazil, his first PhD in urology in 2005 at the Federal University of São Paulo and his second PhD in gynecology in 2007 at the Botucatu Medical School in São Paulo State University. At present he is the founder partner and managing director of Fertility - Assisted Fertilization Centre in São Paulo and scientific director at Sapientiae Institute in São Paulo.

4 - HIỆU QUẢ LÀM SÀNG - SO SÁNH IMSI VÀ ICSI

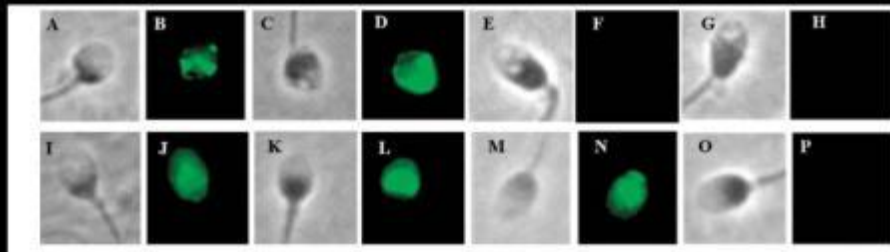
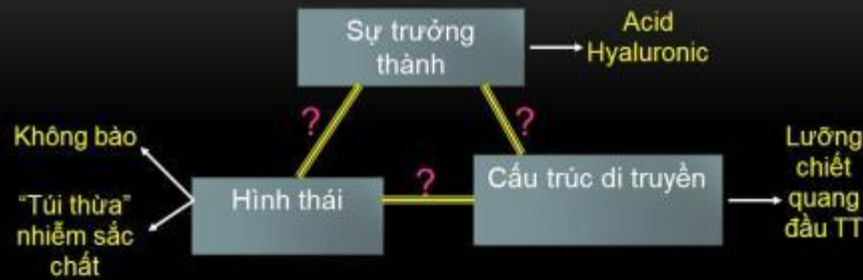
Table 1 Quality and characteristics of studies included in the review of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI).

Trial	Design	Participants	Numbers		Outcomes
			Experimental (IMSI)	Control (ICSI)	
Bartoov et al. (2003)	Comparative	50 couples undergoing IMSI (male factor infertility, female age <37 years, more than three retrieved metaphase II oocyte in the last ICSI cycle, at least two previous consecutive failed ICSI cycles), matched with 50 couples undergoing ICSI	50	50	Fertilization rate, top-quality embryo rate, implantation rate, pregnancy rate, miscarriage rate
Berkovitz et al. (2006)	Comparative	80 couples (male factor infertility, female age <37 years, at least two previous consecutive failed ICSI cycles), matched with 80 couples undergoing ICSI	80	80	Fertilization rate, top-quality embryo rate, implantation rate, pregnancy rate, miscarriage rate
Antónori et al. (2008)	Randomized	446 couples (at least two previous diagnosis of severe oligoasthenozoospermia, at least 3 years of primary infertility, female age <35 years and undetected female factor) randomly allocated to receive ICSI and IMSI treatments	227	219	Fertilization rate, implantation rate, pregnancy rate, miscarriage rate

4 - HIỆU QUẢ LÀM SÀNG - SO SÁNH IMSI VÀ ICSI

- Không có sự khác biệt có ý nghĩa về tỷ lệ thụ tinh
- IMSI cho tỷ lệ "phôi tốt nhất" (top quality embryo) cao hơn đáng kể (OR 1,83; KTC 95%, dao động OR 1,50-2,24)
- IMSI giúp làm tăng rõ rệt tỷ lệ làm tổ (OR 2,72; KTC 95%, dao động OR 1,50-4,95)
- IMSI làm giảm đáng kể tỷ lệ sảy thai (OR 0,42; KTC 95%, dao động OR 0,23-0,78)

5-IMSI VÀ MỘT SỐ VẤN ĐỀ LIÊN QUAN

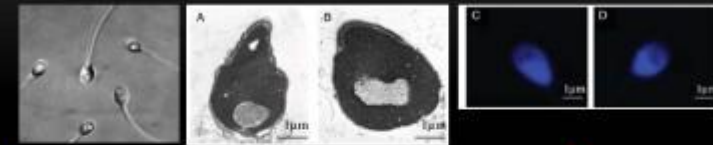


AVENDANO VÀ OEHNINGER 2011

5-IMSI VÀ MỘT SỐ VẤN ĐỀ LIÊN QUAN

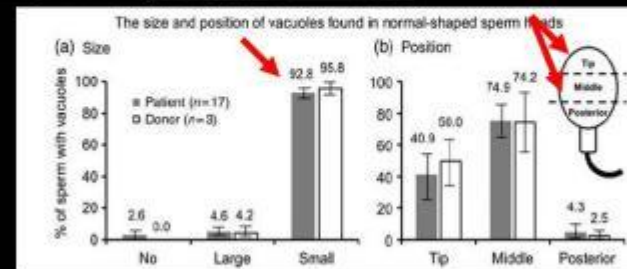
Không bào

KHV quang học KHV điện tử KHV huỳnh quang



Perdrix 2011

Vị trí



Seiji W 2010

Kích thước > 4% S nhân (Bartoov 2002)

không bào TO > 13% (Saidi 2008)

> 12,4% (Perdrix 2012)

???

5-IMSI VÀ MỘT SỐ VẤN ĐỀ LIÊN QUAN

Không bào

❖ Không bào nhân là yếu tố quan trọng nhất liên quan đến giá trị lâm sàng của ICSI (Berkovitz, 2006).

❖ Có sự tương quan giữa không bào TO và DNA phân mảnh (Bartoov 1981, Berkovitz 2005, Antinori 2008)

❖ Tiêm TT không có không bào hay có 1-2 không bào nhỏ cho tỷ lệ phôi nang cao hơn tiêm TT có không bào to ở nhân (Vanderzwalmen 2008)

5-IMSI VÀ MỘT SỐ VẤN ĐỀ LIÊN QUAN

"Túi thừa" nhiễm sắc chất

International Journal of Andrology
International Journal of Andrology ISSN 0105-2036

ORIGINAL ARTICLE

Significance of extruded nuclear chromatin (regional nuclear shape malformation) in human spermatozoa: implications for ICSI

A. L. Mauri,¹ J. B. A. Oliveira,¹ R. L. R. Baruffi,¹ C. G. Petersen,¹ L. D. Vagnini,¹ F. C. Massaro,¹ L. F. I. Silva,¹ A. P. M. Nicoletti¹ and J. G. Franco Jr¹*

¹Center for Human Reproduction, Prof. Franco Jr., Ribeirão Preto, ICRPPT - Paulista Center for Diagnosis, Research and Training, Ribeirão Preto, and ²Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, Brazil

Keywords:

DNA damage, DNA denaturation, DNA fragmentation, extruded nuclear chromatin, ICSI, MSOR

Correspondence:

Dr. Gonçalves Franco Jr, Av. Prof. João Naves, 669 - CEP 14025-710, Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail: frcoj@ibb.com.br or jfr@ibb.com.br

Received 10 January 2010; revised 7 August 2010; accepted 7 September 2010

doi:10.1111/j.1365-2603.2010.01155.x

Summary

The aim of this study was to determine the extent of DNA fragmentation and the presence of denatured single-strand or normal double-strand DNA in spermatozoa with extruded nuclear chromatin (ENC) selected by high magnification. Fresh semen samples from 35 patients were prepared by discontinuous isolate concentration gradient. Spermatozoa with normal nucleus (NN) and ENC were selected at 8400 \times magnification and placed on different slides. DNA fragmentation was determined by TUNEL assay. Denatured and double-stranded DNA was identified by the acridine orange fluorescence method. DNA fragmentation was not significantly different ($p = 0.88$) between spermatozoa with ENC (19.6%) and those with NN (20%). However, the percentage of spermatozoa with detectable denatured-stranded DNA in the ENC spermatozoa group (59.1%) was significantly higher ($p < 0.0001$) than in the NN group (44.9%). The high level of denatured DNA in spermatozoa with ENC suggests premature decondensation and disorganization of sperm chromatin fibres. The results show an association between ENC and DNA damage in spermatozoa, and support the routine morphological selection and injection of motile spermatozoa at high-magnification intracytoplasmic sperm injection.

TT có "túi thừa" nhiễm sắc chất có tỷ lệ DNA bất thường cao hơn TT không có "túi thừa"

Độ phóng đại x 8400 lần



Tình trùng và khả năng lưỡng chiết quang

Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection

Luca Gianaroli, M.D.,^a M. Cristina Magli, M.Sc.,^a Anna P. Ferraioni, M.D.,^a Andor Crippa, Ph.D.,^a Michela Lappi, B.Sc.,^a Serena Capitani, Ph.D.,^a and Baccio Baccetti, M.D.^b

^a Reproductive Medicine Unit, Italian Society for the Study of Reproductive Medicine, Bologna, Italy; and ^b Interdepartmental Centre for Male Infertility, Unit of Applied Biology, Department of Surgery Policlinico, "S. Maria alle Scotte," Siena, Italy

Objective: To verify clinical outcome after injection of spermatozoa that have undergone the acrosome reaction (reacted spermatozoa) vs. those still having an intact acrosome (nonreacted spermatozoa).

Design: Prospective, randomized study.

Setting: Reproductive Medicine Unit, Italian Society for the Study of Reproductive Medicine, Bologna, Italy.

Patient(s): According to a prospective randomization including 71 couples with severe male factor infertility, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was performed under polarized light that permitted analysis of the pattern of birefringence in the sperm head. Twenty-three patients had their oocytes injected with reacted spermatozoa, 26 patient's oocytes were injected with nonreacted spermatozoa, and in 22 patients both reacted and nonreacted spermatozoa were injected.

Intervention(s): Intracytoplasmic sperm injection was performed under polarized light to selectively inject acrosome-reacted and acrosome-nonreacted spermatozoa.

Main Outcome Measure(s): Rates of fertilization, cleavage, pregnancy, implantation, and ongoing implantation.

Result(s): There was no effect on the fertilizing capacity and embryo development of either type of sperm, whereas the implantation rate was higher in oocytes injected with reacted spermatozoa (39.0%) vs. those injected with nonreacted spermatozoa (8.6%). The implantation rate was 24-4% in the group injected with both reacted and nonreacted spermatozoa. The delivery rate per cycle followed the same trend.

Conclusion(s): Spermatozoa that have undergone the acrosome reaction seem to be more prone to supporting the development of viable ICSI embryos. (Fertil Steril® 2010;93:807-13. ©2010 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Acrosome reaction, birefringence, embryo implantation, microscopy, oligoastheno-teratospermia, sperm morphology, sperm selection, testicular sperm

Tình trùng và khả năng lưỡng chiết quang

Tỉ lệ phân mảnh DNA thấp hơn
(Crippa 2009, Petersen 2011)

Tỉ lệ "đã xảy ra phản ứng acrosome" cao hơn
(Gianaroli, 2010)

Tỉ lệ làm tổ cao hơn (Gianaroli, 2010)

Lưỡng chiết quang toàn phần ở vùng đầu = chưa có phản ứng acrosome (Baccetti, 2004)



Lưỡng chiết quang bán phần ở vùng sau túi acrosome = "đã xảy ra phản ứng acrosome" (Baccetti, 2004)

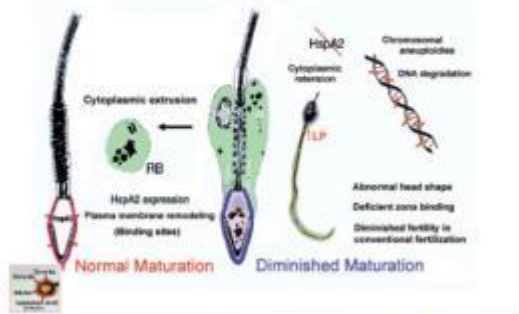
Lưỡng chiết quang bán phần ở vùng sau túi acrosome và có không bào

M C MAGLI VÀ CS 2012

IMSI hay PICSI ???

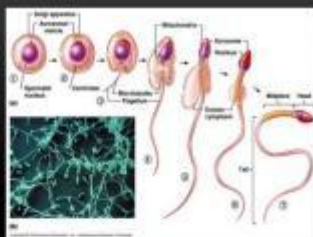
(Physiology ICSI)

HspA2 là protein đặc hiệu có ở TT trưởng thành



Garnio, 2007

PICSI làm giảm thời gian chọn lựa tinh trùng IMSI



Tình trùng trưởng thành

Thụ thể bề mặt gắn kết hyaluronate

Peterson 2010



6- ĐỀ TÀI: ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA KỸ THUẬT IMSI TRONG TTTON

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1-Thiết kế NC: NC ngẫu nhiên lâm sàng có đối chứng

2-Địa điểm: Khoa Hiếm Muộn Bệnh viện Từ Dũ

3-Thời gian: 01/06/2011- 01/06/2012

4-Đối tượng NC

Các cặp vợ chồng TTTON bằng phương pháp ICSI tại Khoa Hiếm Muộn BV Từ Dũ đồng ý tham gia vào nghiên cứu, thuộc một trong hai nhóm bệnh nhân sau:

- ❖ Chồng được chẩn đoán tình trùng dị dạng nặng (< 4% hình dạng bình thường- WHO 2010, ít nhất 2 kết quả tinh dịch đồ)
- ❖ Vợ có tiền sử sảy thai ít nhất 2 lần

6- ĐỀ TÀI: ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA KỸ THUẬT IMSI TRONG TTTON

Một số kết quả ban đầu

- ❖ Lắp ráp, vận hành hệ thống IMSI : 9 tháng
- ❖ Thiết lập quy trình IMSI
- ❖ Thực hiện quy trình IMSI: 12 ca
 - o Tuổi vợ 26-45, tuổi chồng 33-56 tuổi, TT < 4% hình dạng bình thường
 - o Chất lượng phôi ngày 3: 4 ca tốt, 6 ca khá, 2 ca trung bình
 - o Chuyển phôi ngày 3, 3phôi/BN
 - o Tỷ lệ thai : 8/12 ca (β -hCG), trong đó 6/8 ca có tim thai

21

7- Ứng dụng của MSOME ngoài IMSI

Human Reproduction, Vol.26, No.11 pp. 2944-2949, 2011

Advanced Access publication on August 19, 2011 | doi:10.1093/humrep/drr258

human
reproduction

CASE REPORT Andrology

Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia

N. Sermondade^{1,2*}, E. Hafhouf¹, C. Dupont¹, S. Bechoua³, C. Palacios¹, F. Eustache¹, C. Poncelet⁴, B. Benzacken¹, R. Lévy^{1,2}, and C. Sifer¹

¹Service d'Histologie Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), Avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy, France; ²Unité de Recherche en Génétique Humaine, UFR, UMS7 Inseam - U1125 Inra - Cnam, Université Paris 13, CNRS UMR 8017 Biologie, France; ³Service de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU de Dijon, Hôpital du Bocage, 21079 Dijon, France; ⁴Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), 93143 Bondy, France

*Correspondence address. Tel: +33-1-48-03-66-80; Fax: +33-1-48-02-58-44; E-mail: nsermondade@jr.aphp.fr

Submitted on May 2, 2011; resubmitted on June 24, 2011; accepted on July 7, 2011

ABSTRACT: We here report a successful pregnancy and healthy childbirth obtained in a case of total globozoospermia after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) without assisted oocyte activation (AOA). Two semen analyses showed 100% globozoospermia on classic sperm cytogram. **Plate sperm organelle morphology examination (PSOME) analysis at $\times 10\,000$ magnification confirmed the round-headed aspect for 100% of sperm cells, but 1% of the spermatozoa seemed to present a small bud of acrosome.** This particular aspect was confirmed by transmission electron microscopy and anti-CD46 staining analysis. Results from sperm DNA fragmentation and fluorescence in situ hybridization analyses were normal. The karyotype was 46,XY, and no mutations or deletions in SPATA16 and DPY19L2 genes were detected. Considering these results, a single IMSI cycle was performed, and spermatozoa were selected for the

KẾT LUẬN

- ❖ Phương pháp chọn tinh trùng trước khi thực hiện ICSI đóng vai trò đặc biệt quan trọng
- ❖ Kỹ thuật IMSI giúp chọn lựa chính xác hơn tinh trùng mang hình thái bình thường.
- ❖ Mặc dù cần trang bị hệ thống IMSI và cần nhiều thời gian hơn để chọn lựa tinh trùng, tuy nhiên hiệu quả lâm sàng do IMSI mang lại là cao hơn đáng kể so với kỹ thuật ICSI cổ điển.
- ❖ Cần có nhiều hơn nữa những thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng so sánh IMSI và ICSI nhằm xác định lợi ích lâm sàng thực sự mà IMSI mang lại, nhưng bước đầu hiệu quả của kỹ thuật ICSI cải tiến này đã được xác nhận.

CẢM ƠN