MİKROAKIŞKAN ÇİP VE GRADİENT YÖNTEMİYLE SEÇİLEREK ICSI YAPILAN ASTHENOTERATOZOOSPERMİ HASTA GRUPLARINDA EMBRİYO KALİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Çağla Güler
181503101

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Danışman: Prof. Dr. Ümit Özekici

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ekim, 2020

MİKROAKIŞKAN ÇİP VE GRADİENT YÖNTEMİYLE SEÇİLEREK ICSI YAPILAN ASTHENOTERATOZOOSPERMİ HASTA GRUPLARINDA EMBRİYO KALİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Çağla Güler
181503101
Orcid: 0000-0003-0506-4057

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Danışman: Prof. Dr. Ümit Özekici

İstanbul
T.C. Maltepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ekim, 2020



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

maltepe üniversitesi	LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI	Doküman No	FR-178
		İlk Yayın Tarihi	01.03.2018
		Revizyon Tarihi	23.01.2020
		Revizyon No	01
		Sayfa	1

05/10/2020

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bulguların sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilmeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; çalışmanın Maltepe Üniversitesinde kullanılan "bilimsel intihal tespit programı" ile tarandığını ve öngörülen standartları karşıladığını beyan ederim.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Çağla Güler

Hazırlayan: Enstitü Sekreterliği	Onaylayan: Kalite Yönetim Koordinatörlüğü

TEŞEKKÜR

Bana Maltepe Üniversite Hastanesi Tüp Bebek Merkezi kapılarını açan, tez döneminde gerekli tüm imkanları sağlayan ve bana yol gösteren tez danışmanım saygıdeğer Prof.Dr.Ümit Özekici hocama içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitim süresince bana kattığı teorik bilginin yanı sıra, tez dönemindeki destek ve katkılarından, değerli bilim insanı, sayın hocam Prof.Dr.Mehmet CINCIK'a çok teşekkür ederim.

Tez konusu arayışımda bana katkı sağlayan, laboratuvar bilgi ve becerilerimin geliştirilmesinde bana destek olan, tez çalışmamın embriyoloji ayağını yürüten ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sayın Uzm.Emb.Süreyya MELİL'e çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden lisansüstü eğitimime kadar her zaman yanımda olan ve tüm bu süreçte beni cesaretlendiren can arkadaşım ve aynı zamanda meslektaşım Tuğçe BOZKURT'a çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her türlü desteği sağlayan, bana her daim güvenen ve inanan annem Serpil Güler, babam Çetin Güler ve ağabeyim Uluç Güler'e çok teşekkür ederim.

Çağla Güler

Ekim 2020

ÖZ

MİKROAKIŞKAN ÇİP VE GRADİENT YÖNTEMİYLE SEÇİLEREK ICSI YAPILAN ASTHENOTERATOZOOSPERMİ HASTA GRUPLARINDA EMBRİYO KALİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Çağla Güler
Yüksek Lisans Tezi
Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Danışman: Prof. Dr. Ümit Özekici
Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2020

Yardımla üreme teknolojilerinden faydalanacak çiftlerde, mikroenjeksiyonda kullanılacak sperm seçimi önemlidir. Klasik sperm seçim yöntemlerinde kullanılan seri sanrifüjlemenin DNA hasarına sebep olduğu gösterilmiş ve mikroakışkan çip sperm izolasyon yöntemi geliştirilmiştir. Literatürde mikroakışkan çip yönteminin embriyo gelişimine etkisi gösterilmiştir ancak asthenoteratozoospermi(ATZS) vaka gruplarındaki etkinliği yeterince aydınlatılmamıştır. Bu çalışmaya ATZS erkek ve kadın yaşı ≤38 olan, Maltepe Üniversite Hastanesi ÜYTE Merkezine başvuran 22 çift dahil edildi. ATZS gruplarında motilite düşük olduğundan Fertile Ultimate çip kullanıldı. Dansite gradient santrifügasyon (DGS) ile mikroakışkan çip yöntemleriyle seçilmiş spermler ile 2 gruba ayrılmış kardeş oositlerin mikroenjeksiyon işlemi yapıldı ve embriyo gelişimleri takip edilerek, blastokist oluşumları değerlendirdi. İstatistiksel değerlendirme R istatistik paketi ile yapıldı. Parametrik olanlar için student's t-testi, parametrik olmayanlar için Wilcox testi uygulandı ve p değeri <0.05 olarak kabul edildi. Değerlendirme sonucunda mikroakışkan çip yönteminin DGS yöntemine göre 5. günde daha iyi kalitede blastokist ($p=0.029$) geliştirdiği gözlendi. Embriyo gelişimini etkileyen birçok faktör olduğundan sperm seçiminin embriyo gelişimine etkisinin daha iyi anlaşılması için çalışmadaki vaka sayısı arttırılarak farklı merkezlerde denenmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: 1. Asthenoteratozoospermi; 2. Mikroakışkan çip; 3. Dansite Gradient Santrifügasyon; 4. Blastokist

ABSTRACT

EVALUATION OF EMBRYO QUALITY IN ASTHEOTERATOZOOSPERMIA PATIENT GROUPS SELECTED BY MICROFLUIDIC CHIP AND GRADIENT METHOD

Cagla Guler
Master Thesis
Department Of Clinical Embryology
Clinical Embryology Master Programme
Thesis Advisor: Prof. Dr. Umit Ozekici
Maltepe University Graduate School, 2020

Choosing of the sperm which will be used in microinjection is important for couples want to use assisted reproductive technologies. It has been shown that serial centrifuging causes DNA damage at classical sperm sorting methods and microfluidic chip (MFC) sperm isolation procedure developed. Effect of MFC procedure in embryo development shown in literature however it's effectiveness at asthenoteratozoospermia (ATZS) case groups not fully enlightened. ATZS male and female 22 couples who has applied to Maltepe University Hospital ART Center, aged equal or below 38, included to this study. Due to low motility at ATZS groups, Fertile Ultimate MFC was used. Microinjection process of sibling oocytes divided to 2 groups done with sperms, choosen via MFC sperm selecting procedure with dansity gradient centrifuge (DGS) and blastocyst formation evaluated with observing embryo developments. Statistical evaluation done wıth R statistic package, t-test for parametrics, Wilcox test for non-parametrics applied and p value taken as <0.05. As result of evaluation, it has been observed that MFC procedure developed better quality blastocyst (p=0.029) at 5th day compared to DGS procedure. Due to many factors effecting embryo development, to understand effect of sperm choice to embryo development, it is recomended that increasing case number and trying this study in various ART Centers.

Keywords: 1. Asthenoterazootospermia; 2. MicroFluidic Chip; 3. Density Gradient Centrifugation; 4. Blastocyst.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZ v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
KISALTMALAR x
ÖZGEÇMİŞ xi
BÖLÜM 1. GİRİŞ 1
Problem 2
Amaç 4
Önem 4
Varsayımlar 4
Sınırlıklar 4
Tanımlar 5
BÖLÜM 2. YÖNTEM 6
2.1 Asthenoteratozoospermi Vakalarının Semen Analizi İle Belirlenmesi 6
2.1.1 Makroskobik Değerlendirme 7
2.1.2 Makler Sayım Çemberinde Semenin Mikroskobik Değerlendirilmesi 8
2.1.3 Konsantrasyon(Dansite) Ölçümü 8
2.1.4 Total Sperm Sayısının Hesaplanması 9
2.1.5 Motilitenin Değerlendirilmesi 9
2.1.6 Morfolojik Değerlendirme 9
2.2 Yumurta Toplama İşlemi (OPU-Oosit Pick-Up) 11
2.3 Oosit Denüdasyonu ve Matürasyon Tayini 12
2.4 Mikroenjeksiyon İşlemi İçin Spermin Hazırlanması 12
2.4.1 Mikroakışkan Çip Yöntemi: 12
2.4.2 Dansite Gradient SantrifüjlemeYöntemi (DGS) 13
2.5 Mikroenjeksiyon-ICSI(Intra Cytoplasmic Sperm Injection) İşlemi 14
2.5.1 ICSI Petrisi Hazırlama 14
2.5.2 Mikroenjeksiyon İşlemi 15
2.6 Embriyo Kültürü 15
Araştırma Modeli 15
Evren ve Örneklem 16
Veriler ve Toplanması 17
Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması 17
BÖLÜM 3. BULGULAR VE YORUMLAR 18
Bulgular 30
Yorumlar 21
BÖLÜM 4. SONUÇ 23
Özet 23
Yargı 23
Öneriler 23
EK'LER 25
KAYNAKÇA 26

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Semen Parametreleri (World Health Organization, 2010). 8

Tablo 2: Motilitenin Sınıflandırılması 9

Tablo 3: Grupların Yaş Ortalamaları 18

Tablo 4: Semen Parametrelerinin Karşılaştırılması 19

Tablo 5:Embriyo Gelişimi ve Değerlendirilmesi (Veeck & Zaninovic, 2003) 20

Tablo 6: Blastokist Sınıflandırması (Gardner & Schoolcraft, 1999) ‘dan uyarlandı. 20

Tablo 7: Sperm Seçim Yöntemlerine Göre Embriyo Gelişimlerinin Karşılaştırılması 21

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Prospektif çalışma sürecindeki adımlar 6

Şekil 2: Morfolojik anomalisi olan insan sperm hücrelerinin şematik çizimler…11

Şekil 3: Fertile Ultimate mikroakışkan sperm ayıklama çipi..... 13

Şekil 4: Dansite Gradient Sanrifügasyon..... 14

KISALTMALAR

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection-Mikroenjeksiyon

IVF : In Vitro Fertilizasyon

DGS : Dansite Gradient Santrifügasyon

YÜT : Yardımla Üreme Teknikleri

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

ROS : Reaktif Oksijen Türevleri

OPU : Oosit Pick-Up - Oosit toplama işlemi.

PGT : Preimplantasyon Genetik Tanı

ATZS : Asthenoteratozoospermi

PVP : Polyvinylpyrrolidon

ÜYTE : Üremeye Yardımcı Tedavi

ÖZGEÇMİŞ

Çağla Güler

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Eğitim

Derece	*Yıl*	*Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı*
Y.Ls.	2019	Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Ls.	2018	Acıbadem Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Lise	2014	İstek Vakfı Fen Lisesi Uluğbey Kampüsü

İş/İstihdam

Yıl	*Görev*	
2019 -	Biyolog	Maltepe Üniversitesi Hastanesi ÜYTE Merkezi
2017 -	Stajyer	Bahçeci Umut Tüp Bebek Merkezi

Kişisel Bilgiler

Doğum yeri ve yılı : İstanbul, 1996 Cinsiyet: K
Yabancı diller : İngilizce (İyi); Almanca (Başlangıç)
e-posta : caglaguler000@gmail.com

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Dünya çapında her geçen yıl yüksek bir ivme ile artan ve bir sağlık problemi olan infertilite, üreme dönemindeki çiftlerin %8-12'sini etkilemektedir. İnfertilite <35 yaş kadınlarda 1 yıl, ≥35 yaş kadınlarda 6 ay boyunca korunmaksızın düzenli ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır (Inhorn & Patrizio, 2015). İnfertilite de oran; %30-40 erkek faktörü, %40-50 kadın faktörü ve %20 açıklanamayan nedenlerden olduğu bildirilmiştir (Boivin vd., 2007).

1978 yılında in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi kullanılarak, laboratuvar ortamında oosit ile spermin bir araya getirilmesi sonucu oluşan embriyonun transfer edilmesi ile Louise Brown adı verilen ilk tüp bebek dünyaya gelmiştir. Bu gelişme, infertil çiftler için umut ışığı olmakla beraber IVF alanında birçok çalışma yapılmış ve teknikler daha da geliştirilmiştir ("Cellular Aspects of in Vitro Fertilization (Ultrastructural and Cytogenetic Studies of Human Gametes and Zygotes)", 1987). Günümüzde infertil çiftler yardımla üreme teknikleri (YÜT) ile çok daha yüksek oranlarla çocuk sahibi olabilmektedirler. YÜT'de başarıyı; doğru tedavi protokolü, prosedüre uygun laboratuvar uygulamaları ve ek manipülasyonlar, kadın vücudu ve uterusun uygunluğu büyük ölçüde etkilemektedir (Mascarenhas vd., 2012).

IVF için konvansiyonel ve mikroenjeksiyon teknikleri uygulanabilmektedir. Son yıllarda mikroenjeksiyon, diğer uygulamalara göre başarı oranı daha yüksek ve en sık kullanılan yardımla üreme yöntemlerindendir (van der Westerlaken vd., 2005). Mikroenjeksiyon uygulamasında kullanılacak olan sperm, fertilizasyonu ve embriyo kalitesini büyük ölçüde etkileyebilir dolayısıyla erkek faktörü olumsuz sonuçlanan IVF denemelerine %30-50 oranında katkıda bulunabilmektedir (Asghar vd., 2014).

Sperm seçimi için birçok yöntem geliştirilmiştir. IVF laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerden biri de dansite gradient santrifüjleme (DGS) yöntemidir. Ancak son yıllarda seri santrifüjlemenin DNA hasarına ve fragmantasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Malvezzi vd., 2014; Wang vd., 2014; Fariello vd., 2009). DNA hasarına maruz kalmış spermler mikroenjeksiyonda kullanıldığında fertilizasyonu, embriyo kalitesini ve hatta implantasyonu etkilemektedir (Alvarez Sedo vd., 2012; Francavilla, 2001). DNA hasarının en az düzeye indirilmesi için yeni sperm seçme teknolojisi mikroakışkan çip sperm izolasyon yöntemi geliştirilmiştir. Mikroakışkan çip yönteminde

DGS'ye kıyasla DNA fragmantasyon seviyelerinin çok daha düşük olduğu ve elde edilen sperm motilitesinin çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca mikroakışkan çip sonrası elde edilen spermlerin daha normal morfolojide de olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Mikroakışkan çip yönteminde in vivo ortamda olduğu gibi en yüksek hareketlilikteki spermler aralarında yarışarak bitiş noktasına ulaşır ve doğal seçilime benzer şekilde sperm seçimi gerçekleşir (Bulgurcuoğlu Kuran & Altun, 2015; Quinn vd., 2018).

Önceki çalışmalarda mikroakışkan çip yöntemi birçok vaka grubunda denenmiş olup asthenoteratozoospermi vaka gruplarında etkinliği yeterince aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada asthenoteratozoospermi vakaları için bölünmüş semen örnekleri mikroakışkan çip ve DGS yöntemleri kullanılarak kardeş oositlerin mikroenjeksiyonu sonucu embriyo gelişimleri değerlendirildi. Kullanılan yöntemlerin blastokist oluşumuna katkısı gözlemlenerek, asthenoteratozoospermi vakaları için efektif yöntemin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Problem

Son yıllarda infertilite, dünya genelinde artan bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Erişkin çağdaki çiftlerin yaklaşık %15'i infertilite ile ilişkilidir (Speroff vd., 1999). Erkek faktörü infertiliteyi %30-40 oranında etkilemektedir (Winters & Walsh, 2014; Aka vd., 2013). Erkek infertilitesine neden olan birçok faktör vardır. Bu faktörler arasında düşük sperm motilitesi (asthenospermi) ve anormal sperm morfolojisi (teratospermi) de yer almaktadır (Morgante vd., 2010). Düşük sperm motilitesi ve morfolojisi erkek infertilitesinin sık görülen alt türlerindendir (Asghari vd., 2017).

Sperm morfolojisinin hem in vivo hem de in vitro fertilizayon potansiyelinde önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (García-Vázquez vd., 2016). İnfertilite tedavisinde Kruger Kriterleri göz önünde bulundurularak, normal morfolojiye en yakın spermin kullanılması önem taşımaktadır (Morelli vd., 2010). Kruger kriterlerine göre spermin akrozom, baş, çekirdek, boyun, orta parça ve kuyruk bozuklukları morfolojik olarak değerlendirilmektedir (Kruger vd., 1988; Kupker vd., 1998; World Health Organization, 2010). Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) 2010 yılında yayımladığı kılavuzdaki referans değerlere göre; total sperm hareketliliğinin %40'tan düşük olması ve/veya ileri hareketliliğin %32'den düşük olması durumu asthenozoospermi, Kruger

kriterlerine göre morfolojik değerlendirme %4'ten düşük ise teratozoospermi, her iki durumda mevcutsa asthenoteratozoospermi olarak tanımlanmaktadır.

YÜT'e başvuran asthenoteratozoospermi vakaları mikroenjeksiyon yöntemi kullanılarak çocuk sahibi olabilmektedirler (De Braekeleer vd., 2015; Zini vd., 2000). Spermin kalitesi fertilizasyonu ve embriyo gelişimini ciddi düzeyde etkilemektedir (Le Lannou & Blanchard, 1988). Yapılan bir çalışmada asthenoteratozoospermi vaka spermleri mikroenjeksiyonda kullanıldığında fertilizasyon oranlarının %63,4 olduğu gösterilmiştir (Verheyen vd., 1999). Ayrıca başka bir çalışmada ATZS ile DNA fragmantasyon indeksinin karakterize olduğu belirtilmiştir (Tang vd., 2020).

Dolayısıyla mikroenjeksiyon için sperm seçimi önem taşımaktadır (Le Lannou & Blanchard, 1988). Mikroenjesiyon öncesi sperm seçim yöntemleri kullanılarak, ölü, zarar görmüş ve sperm dışı hücreler ortadan kaldırılarak daha verimli spermlerin seçimi sağlanmaktadır (Sepúlveda vd., 2018). Kaliteli sperm seçimi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Klasik sperm hazırlama tekniklerinden olan DGS ve yüzdürme yöntemleri (swim-up), sedimantasyon ya da migrasyon temeline dayanarak spermin seçilmesini sağlamaktadır (Akerlöf vd., 1987). Sperm seçiminde DGS tekniği kullanıldığında seri santrifüjlemenin sperm canlılığına zarar verdiği, ROS'a (reaktif oksijen türevleri) neden olduğu, sperm yüzdesini azalttığı ve DNA hasarını arttırdığı gösterilmiştir (Zini vd., 2000).

Tüm bu sperm yıkama yöntemlerini takiben geliştirilmiş olan mikroakışkan çip yöntemi normal fizyolojiyi taklit eder. mikroakışkan çip yöntemi, yardımla üreme tekniklerini geliştirmek için kullanılan, fertilizasyon ve gebelik olasılığını arttırmak için en hareketli, fonksiyonel olarak normal ve iyi morfolojideki spermleri toplamayı amaçlayan bir sperm seçim yöntemidir. Mikroakışkan çip yönteminde diğer sperm seçme yöntemlerine kıyasla santifüjleme yapılmamaktadır. Doğal seleksiyona benzer şekilde birbirleri ile yarışarak, fertilizasyon kabiliyeti en yüksek olan spermler seçilmektedir (Suarez & Wu, 2016).

Önceki çalışmalarda mikroakışkan çip yönteminin blastokist oluşumuna etkisi araştırılmış fakat spesifik asthenoteratozoospermi hasta gruplarındaki etkinliği yeterince aydınlatılmamıştır.

Bu çalışmada, asthenoteratospermi vaka spermlerinin, DGS ve mikroakışkan çip yöntemi ile seçilip mikroenjeksiyonda kullanılması, blastokiste kadar ki embriyo

gelişimlerinin karşılaştırılarak değerlendirilmesi ve hangi sperm seçim yönteminin vaka yararı açısından efektif olduğu hakkında anlamlı sonuç bulunması amaçlanmaktadır.

Amaç

Bu prospektif çalışmada, asthenoteratozoospermi tanısı konan hastalardan, mikroakışkan çip ve DGS yöntemiyle ayrıştırılarak elde edilen spermlerle fertilize olan oositlerin, blastokiste kadarki gelişimleri gözlemlenecek ve karşılaştırılacaktır. Bu tip vakalarda mikroakışkan çip ve gradient yöntemlerinden hangisinin daha efektif olduğu hakkında anlamlı sonuç bulunması amaçlanmaktadır. Bu araştırmadan elde edilecek bulgular sayesinde asthenoteratozoospermi olan hastalarda efektif yöntemin kullanmasına katkı sağlanacaktır.

Önem

İnfertil bireylerde yardımla üreme yöntemi ile desteklenen tedavilerdeki başarıda kaliteli gametlerin seçilmesi büyük önem taşımaktadır. Oosit için seçilen sperm kalitesi, fertilizasyonu ve embriyo gelişimini etkilemektedir. Asthenoteratozoospermik erkekler DGS yöntemindeki seri santrifüjlemeden etkilenebileceğinden, sperm seçim yöntemlerinin vaka yararına göre tercihi önem taşımaktadır.

Varsayımlar

Sperm seçim yöntemleri ile erkek faktörü minimuma indirilse de, oosit kalitesininde blastokist gelişimini etkileyeceği yadsınamaz bir gerçektir. Bu çalışmada oosit kalitesinin standart olduğu varsayılacaktır.

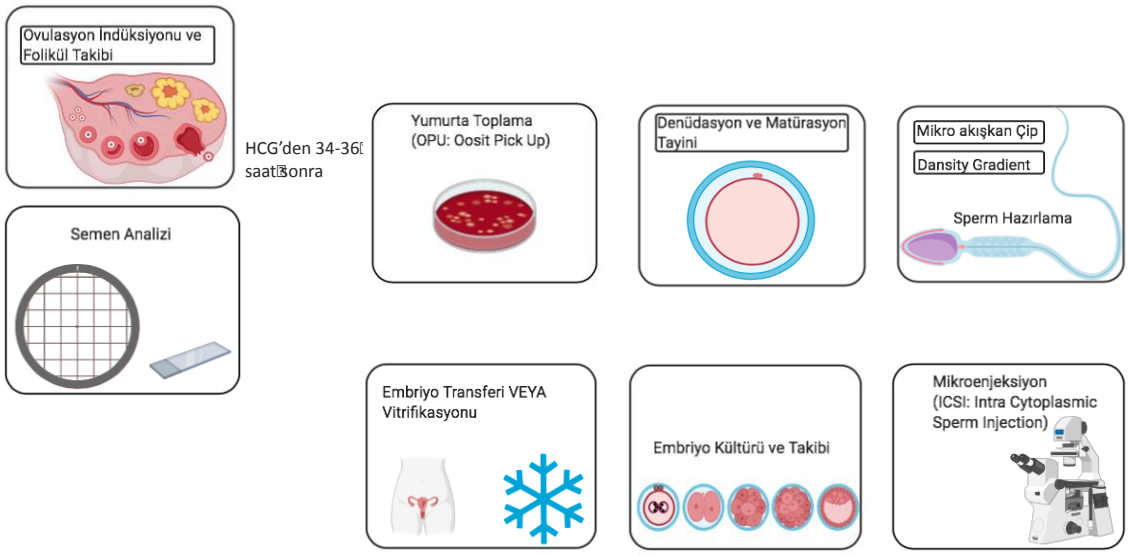
Sınırlılıklar

Çalışmaya asthenoteratozoospermi vakaları, ≥2 matür oosit sayısına sahip çiftler ve 19-38 yaş aralığındaki kadınlar dahil edilecektir. Metafaz I oositten gelişen embriyolar, PGT (Preimplantasyon Genetik Tanı) yapılacak vakalar çalışmaya dahil edilmeyecektir. Mikroakışkan çip maliyeti yüksek olduğundan çalışmaya 22 vaka dahil edilmiştir, genellenemez. Mikroakışkan çip'lerin bir kısmı Maltepe Üniversitesi, bir kısmı Maltepe Üniversitesi Hastanesi ÜYTE Merkezi tarafından karşılanacaktır. Hastadan ücret talep edilmeyecektir.

Tanımlar

Asthenospermi	: Anormal sperm hareketliliği
Teratospermi	: Anormal sperm morfolojisi
Oosit Denüdasyonu	: Oositin mekanik ve kimyasal olarak soyulması
Oosit	: Kadın üreme hücresi
Sperm	: Erkek üreme hücresi
İnfertilite	: Kısırlık
Asthenoteratozoospermi	:Spermin hem motilite hemde morfolojik olarak anormal olması
Sperm Motilitesi	: Sperm Hareketliliği
Matürasyon Tayini	: M2 oositlerin ICSI işlemi için ayrılması
Semen Analizi	: Semen de bulunan sperm hücrelerinin değerlendirilmesi

BÖLÜM 2. YÖNTEM



Şekil 1: Prospektif çalışma sürecindeki adımlar

Yukarıdaki şekilde çalışma boyunca izlenen yol ve adımlar gösterilmiştir. Çalışmanın standardizasyonu için 18-39 yaştaki kadınlar ve 2≥ matür Metefaz II oositi bulunan vakalar çalışmaya dahil edildi. PGD vakaları, dondurma-çözme vakaları ve Metafaz I oositten gelişen embriyolar çalışmaya dahil edilmedi.

2.1 Asthenoteratozoospermi Vakalarının Semen Analizi İle Belirlenmesi

Çiftler infertilite kliniğine başvurduklarında, tedaviye başlamadan semen analizinin yapılması tedavinin gidişatı ve erkek faktörünün tanı ve teşhisi için önemli rol oynamaktadır.

Hasta, semen analizi için en az 2, en çok 7 günlük cinsel perhiz süresi ile ilgili bilgilendirildi. Hastaya ejekülasyon sırasında uyulması gereken kurallar anlatıldı.

Hasta mastürbasyon yoluyla ejekülatı, toksik olmayan steril bir kaba aktardı.

İlk semen fraksiyonları spermatozoa bakımından zengin olduğundan ejekülasyon sonrasında tüm semenin steril numune kabında olup olmadığı teyit edildi.

Numune kabı 5 dakika içerisinde 37 dereceye ayarlanmış inkübatörde veya laboratuvar tezgahı üzerinde bekletildi.

Ejekülasyon sonrası 30 ila 60 dakika arasında:

- Semenin likefaksiyonu ve makroskobik değerlendirme.
- Sperm konsantrasyonu, sayısı ve motilitesini değerlendirme
- Morfolojik değerlendirme için yayma preparatını hazırlama

Dört saat sonra:

- Yayma preparatının fiksasyonu ve boyaması yapıldı. Kuruduktan sonra sperm morfolojisi değerlendirildi.

2.1.1 Makroskobik Değerlendirme

Likefaksiyon: Semen atıldıktan sonra koagüle şekilde olduğundan, değerlendirme için en az 15, en çok 60 dakika homojen hale gelmesi beklendi.

Semen hacmi : Hacmin miktarı total sperm sayısının hesaplanmasına katkıda bulunduğundan, derecelendirilmiş bir pipet yardımıyla hassas ölçüm yapıldı.

Semen viskozitesi: Likefaksiyon sonrası çapı yaklaşık 1,5 mm olan balon pipet yardımıyla semen aspire edildi ve damlamaya bırakılarak viskozitesi değerlendirildi.

Ejakülatın görünümü : Likefiye semen örneğinin gri opelesan renkte ve homojen olup olmadığı değerlendirildi.

2.1.2 Makler Sayım Çemberinde Semenin Mikroskobik Değerlendirilmesi

Tablo 1: Semen Parametreleri (World Health Organization, 2010).

Semen Parametresi	Referans Değerler
Volüm(ml)	**1.5**
Konsantrasyon (10^6/ml)	**15**
Total Sperm Sayısı(10^6/ejekülat)	**39**
Total Motilite(%)	**40**
Progresif Motilite(%)	**32**
Vitalite(%)	**58**
Sperm Morfolojisi(%)	**>4**
pH	**>/=7.2**
Lökosit(10^6/ml)	**<1**

Semen analizleri DSÖ 2010 kılavuzundaki semen parametreleri referans alınarak yapılmıştır.

2.1.3 Konsantrasyon (Dansite) Ölçümü

Likefaksiyon sonrası semen homojenize edildi. Sonrasında 1,5 mm çapındaki balon pipet veya mikropipet aracılığıyla semen aspire edilip, yaklaşık 10 µl olarak makler sayım çemberine damlatıldı.

Faz-Kontrast mikroskobu 20X'lik objektife ayarlandı. Makler Sayım Çemberi mikroskobun tablasına yerleştirildikten sonra kareli alanda dikey 10 ve yatay 10 kare olmak üzere sperm sayımı yapıldı ve not edildi. Sayılan sperm sayısının yarısı, 10^6/ml ile çarpılarak konsantrasyon hesaplandı.

2.1.4 Total Sperm Sayısının Hesaplanması

Total sperm sayısı testislerdeki sperm üretiminin tahmini ölçümüdür. Ejekülat hacmi ile konsantrasyon çarpılarak total sperm sayısı hesaplandı.

2.1.5 Motilitenin Değerlendirilmesi

Semen likefaksiyonu sonrası, 30 ila 60 dakika içerisinde motilite değerlendirildi. Makler sayım çemberine semen damlatıldıktan sonra dikey ve yatay 10 karedeki motil ve immotil spermatozoalar sayıldı ve yüzdesi hesaplandı. Sperm motilitesi analiz edilirken mutlaka progresif ve nonprogresif motilite belirtildi. Dünya Sağlık Örgütü'nün semen analizini standardize etmeye yönelik kılavuzuna göre motilite a,b,c,d olarak sınıflandırılmıştır ve günümüz androloji laboratuvarlarındaki sperm hareketliliğinin değerlendirilmesi bu temel göz önünde bulundurularak yapılmaktadır

Tablo 2: Motilitenin Sınıflandırılması

Motilitenin Sınıflandırılması	
+4 veya a	Hızlı doğrusal hareket
+3 veya b	Yavaş doğrusal hareket
+2 veya c	Yerinde hareket
+1 veya d	Hareketsiz

2.1.6 Morfolojik Değerlendirme

Spermac™ boyama seti, sperm morfoloji numunelerinin hızlı boyama için çözeltileri içerir. Ardışık olarak kısa çözeltilere batırılarak, önceden havada kurutulan preperatların boyanmasını sağlamaktadır.

Spermac ™ Boyama Seti İle Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi:

Boyama kiti fiksatif, A Boyası, B Boyası ve C Boyası içermektedir. Lam üzerine hastanın kişisel bilgileri yazıldı. Likefiye semen numunesi homojenize edildi. Bazal örnekte sperm sayısı ≥20 milyon/ml ise pipet aracılığıyla yaklaşık 5 µl, ≤20 milyon /ml

den az ise 10-20 µl olarak lam üzerine bir lamel yardımıyla 45^{0}'lik açı ile yayıldı. Preperat kurumaya bırakıldı.

Kurumuş preperat fiksatife daldırıldı, en az 5 dakika bekletildi, distile suya 5-6 kez daldırılarak yıkandı ve fazlası kuruma kağıdı ile alındı.

A boyasına daldırıldı, 1-2 dakika bekletildi ve yıkama yapıldı.

B boyasına daldırıldı, 1-2 dakika bekletildi ve yıkama yapıldı.

C boyasına daldırıldı, 1-2 dakika bekletildi ve yıkama yapıldı.

Preperat havada kurumaya bırakıldı.

İmmersiyon yağı kurumuş preperatın üzerine damlatıldı ve 100X büyütmeli mikroskopta incelendi.

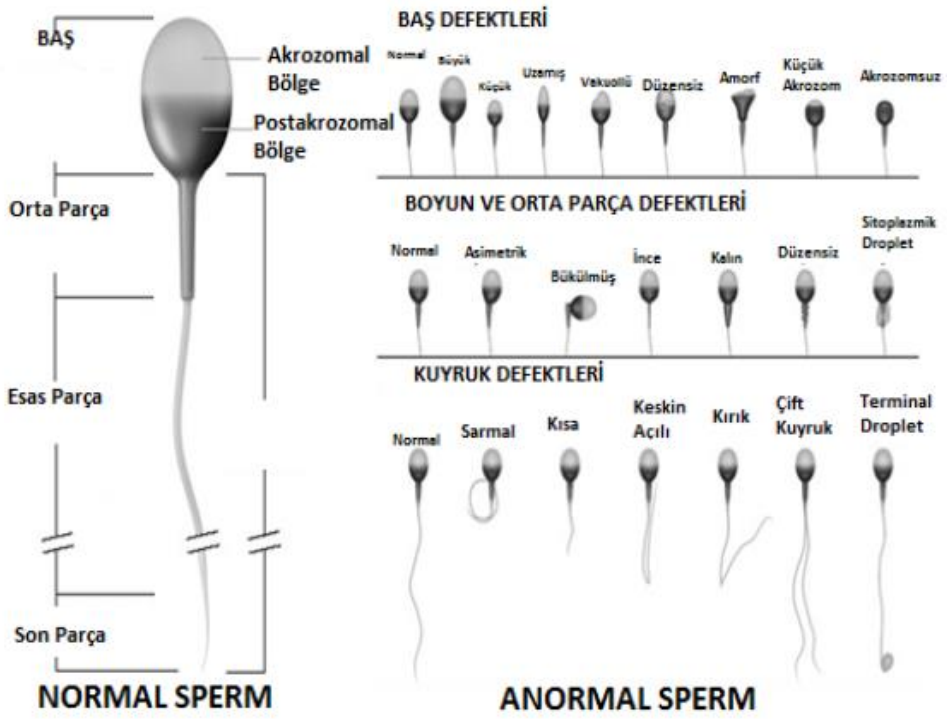
Akrozom : Yeşil

Nükleus : Kırmızı

Ekvatorial Bölüm : Açık Yeşil

Boyun ve Kuyruk : Yeşil boyandı.

İnceleme DSÖ ve KRUGER KRİTERLERİ göz önüne alınarak yapıldı.



Şekil 2: Morfolojik Anomalisi Olan İnsan Sperm Hücrelerinin Şematik Çizimleri (Kadıoğlu Ve Ark.,2011)

Normal morfolojideki spermatozoanın;

- Baş kısmının eni 2-3 µm ve boyu 4-5 µm olmalıdır. Oval, konturları düzgün ve başın %40-%70'lik bölümünü kapsayan akrozoma sahip olmalıdır.
- Boyun kısmı 4-5 µm uzunluğunda ve axiller konumunda başın alt kısmına bağlanmalıdır.
- Kuyruk kısmı 50-55 µm uzunluğunda ve düzgün kıvrımlı olmalıdır (Menkveld vd., 1990).

2.2 Yumurta Toplama İşlemi (OPU-Oosit Pick-Up)

Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanının kontrolünde hastaya uygun ovulasyon indüksiyonu protokolü uygulandı. Foliküller uygun çapa ulaştığında hCG enjeksiyonu (çatlatma iğnesi) için gün ve saat belirlendi. hCG enjeksiyonu sonrası mutlaka 34-36 saatler arasında folikül sıvısı aspire edilmelidir. Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanı folikül sıvısını opu iğnesi aracılığı ve aspiratör cihazı ile oosit için toksik olmayan tüpler

içerisine aspire etti. 37^{o}C'lik sıcak zeminde bulunan 60 mm çapındaki opu petrilerine, aspire edilen folikül sıvısı boşaltıldı. Korona-kumulus kompleksi (COC) makroskobik olarak gözlendikten sonra opu petrisine yayılarak mikroskobik olarak kompleks içerisindeki oosit belirlendi ve önceden 37^{o}C'de ısıtılmış tampon içerikli medium (W/Hepes) içerisine konularak dış ortamın olumsuz etkilerinden uzaklaştırıldı. Yumurta toplama işlemi tamamlandığında toplanan oositler inkübe edilmiş kültür petrisine alındı.

2.3 Oosit Denüdasyonu ve Matürasyon Tayini

Oositlerin kumulus ve korona hücrelerinden temizlenmesi amacıyla COC'lar denüdasyon işlemine alındı. Tampon içerikli medium ve hyaluranidaz enzimi ile denüdasyon petrisi hazırlandı ve etüve kaldırılarak ısıtıldı. COC'lar hyaluranidaz solüsyonunda alındı ve 30-60 sn bekletildi. Stripper'a uygun çaplı (175 µm-150 µl) denüdasyon pipeti takıldı ve al-ver yapılarak kumulusler enzimatik olarak parçalandı. Oositler W/Hepes'li diğer bir damlaciğa taşınarak çapı daha küçük (145 µm) denüdasyon pipeti ile al-ver yapılarak mekanik olarak temizlendi. Son olarak w/Hepes'li kullanılmamış damlacığın içerisine taşınarak al-ver işlemi yapılarak tamamen kumuluslerden temizlendi. Oositler invert mikroskoba alındı ve polar cisimciklerine bakılarak matürasyon tayini yapıldı. Denüdasyon sonrası oositler 37^{o}C'de ünkübe edilmiş kültür petrilerine aktarılarak dinlendirildi.

2.4 Mikroenjeksiyon İşlemi İçin Spermin Hazırlanması

Önceden asthenoteratozoospermi olduğu teşhis edilen hastanın likefiye semeni homojenize edildi ve bazal olarak değerlendirilerek vakanın tanısı teyit edildi. Tekrar tüm semen örneği homojenize edilerek hacmin yarısı başka bir steril numune kabına aktarıldı.

2.4.1 Mikroakışkan Çip Yöntemi:

Fertıie Ultimate® (Koek Biyoteknoloji,Türkiye) mikroakışkan sistemi ile herhangi bir ön işlem basamağı gerektirmeden likefiye olmuş semen numunesinden en hızlı ve genetik materyal olarak en sağlıklı olan serbest oksijen radikallerine en az maruz kalan spermlerin ayrımını sağlamaktadır. Bu çalışmada asthenoteratozoospermi vaka gruplarında sperm sayı kaybı yaşanmaması için Fertile Ultimate mikroakışkan çip kullanıldı.

Mikroakışkan Çip Preparatının Hazırlanması:

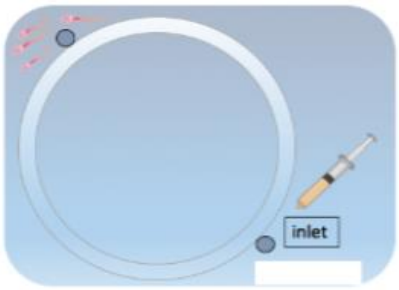
→Alınan numune likefaksiyon amacı ile 37^{o}C'de inkübe edildi.

→Uygun miktardaki Fertile Ultimate sperm hazırlama solüsyonu etüvde ısıtıldı.

→Hastanın kimlik bilgileri mikroakışkan çip üzerine not edildi.

→Steril enjektör ile likefiye örnekten 3.0 ml alındı ve inlet deliğine basıldı. 3.0 ml'den az örnekler için öncesinde inlet deliğine sperm hazırlama solüsyonu basılarak 3 ml'ye tamamlandı.

→Üst-çıkış haznesine steril enjektör ile 1.8 ml sperm hazırlama solüsyonu basıldı ve hazırlanan preperat 37^{o}C'de inkübe edildi. Üst-çıkış haznesinde birikmiş sperm barındıran sıvı steril enjektör yardımıyla çekildi.



Şekil 3: Fertile Ultimate® Mikroakışkan Sperm Ayıklama Çipi

2.4.2 Dansite Gradient SantrifüjlemeYöntemi (DGS)

Olumsuz sperm parametreleri varlığında mikroenjeksiyon işlemi için sperm hazırlama amacı ile kullanılan bir yöntemdir.

İki Katlı Gradient ile Sperm Hazırlama:

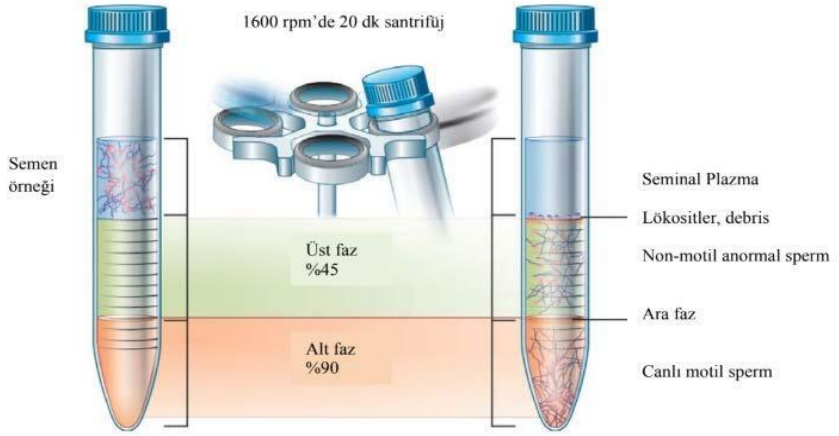
→ Kolloidal silica partikülleri içeren mediumlar ile iki katlı gradient hazırlandı.

→ 15 ml'lik konik tüp içerisine 9 ml puresperm solusyonu ve 1 ml sperm yıkama mediumu kondu, homojenize edilerek %90 yoğunlukta gradient hazırlandı.

→15 ml'lik diğer bir konik tüpe 5 ml puresperm solüsyonu ve 5 ml sperm yıkama mediumu kondu ve homojenize edilerek %50 yoğunlukta gradient hazırlandı.

→ %90'lık gradientten 1 ml steril konik tüpe kondu ve üzerine 1ml %40'lık gradientten çekilerek tüpün duvarına değecek şekilde yavaşça bırakıldı. Çift katlı gradient 37^{o}C'lik etüve kaldırıldı.

Likefiye ejekülat önceden hazırlanmış gradient üzerine yavaşça bırakıldı. Santrifüj dengelendi ve sperm parametrelerine göre santrifüj devri ve süresi ayarlandı. Santrifüj tamamlandı. Gradientin üst kısmında kalan çok miktardaki lökosit, immotil spermler, anormal spermler, çok sayıda döküntü ve germ dışı hücreler balon pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Hareketli ve normal morfolojiye sahip spermler gradientten yüzerek tüpün dipin pellet oluşturdu ve pellet nazikçe pipetlendi.



Şekil 4 : Dansite Gradient Sanrifügasyon (Beydola Et.Al.,2013'dan Alınmıştır.)

2.5 Mikroenjeksiyon-ICSI(Intra Cytoplasmic Sperm Injection) İşlemi

2.5.1 ICSI petrisi hazırlama

Kardeş oositlere 2 farklı yöntem ile ayıklanmış spermler ile ICSI yapılacağından, 2 ayrı ICSI petrisi hazırlandı. Tampon içeren medium ile ICSI petrisine oosit sayısına uygun yaklaşık 5 µl'lik droplar yapıldı. w/Hepes ile sperm drobu yapıldı. Sperm ve oosit drobunun arasına yaklaşık 5 µl %7'lik PVP yayıldı. PVP, sperm drobundan seçilen spermlerin hareketlerini kısıtlayarak kuyruk kırma işleminin kolaylıkla yapılmasını sağlamaktadır. ICSI petrilerinin üzeri önceden ısıtılmış yağ ile kapatıldı ve 37^{o}C'ye ayarlı etüve kaldırıldı.

2.5.2 Mikroenjeksiyon işlemi

Manipülatör ICSI için hazırlandı, Holding ve ICSI pipeti takıldı, ısıtıcı tablası 37^{o}C'ye ayarlandı. DGS yöntemi ile hazırlanan spermler, sperm drobuna basıldı ve kardeş oositlerin yarısı oosit droplarına alındı. ICSI pipeti ile spermler seçildi, PVP drobuna alındı ve kuyrukları kırılarak hareketleri kısıtlandı. Seçilen sperm ICSI pipeti içerisine aspire edildi, holding pipet ile oosit tutuldu ve polar cisimcik 6-12 saat yönünde konumlandırıldı. Sperm hücresi ICSI pipeti aracılığıyla oosit içerisine invaze edildi ve 1-2 defa aspire edilerek oosit aktivasyonu sağlandı. Bu işlem ICSI petrisindeki tüm oositler için tekrarlandı. Mikroenjeksiyon işlemi yapılan oositler inkübe kültür petrilerine taşındı, petriye kimlik bilgileri ve işlemde kullanılan sperm ayıklama yöntemi yazıldı ve inkübatöre kaldırıldı. Hazırlanmış diğer ICSI petrisinin sperm drobuna, mikroakışkan çip ile ayıklanmış spermler basıldı. Kardeş oositlerin kalan diğer yarısı oosit droplarına alındı. ICSI pipeti ile spermler seçildi, PVP drobuna alındı ve kuyrukları kırılarak hareketleri kısıtlandı. Seçilen sperm ICSI pipeti içerisine aspire edildi, holding pipet ile oosit tutuldu ve polar cisimcik 6-12 saat yönüde konumlandırıldı. Sperm hücresi ICSI pipeti aracılığıyla oosit içerisine invaze edildi ve 2-3 defa aspire edilerek oosit aktivasyonu sağlandı. Bu işlem ICSI petrisindeki tüm oositler için tekrarlandı. ICSI işlemi bittiğinde kişinin kimlik bilgilerinin yazılı olduğu kültür petrisine alınarak mikroakışkan çip ile işlem yapıldığına dair işaretlemeler yapıldı ve inkübatöre kaldırıldı.

2.6 Embriyo Kültürü

Embriyo için toksik olmayan petri kaplara, Life Global kültür medyumu ve Life Global paraffin yağ ile kültür ortamı hazırlandı. 24 saat 37^{0}C'de, %6 CO_2, 0_2 ve %89 N içeren inkübatörlerde inkübasyona bırakıldı. İnkübe kültür ortamına mikroenjeksiyonu yapılmış oositler kaldırıldı. Gelişimin 1. ve 3.günleri embriyolar taze kaplara taşındı.

Araştırma Modeli

Bu prospektif çalışmada asthenoteratozoospermi hastalarından mikroakışkan çip ile DGS yöntemi kullanılarak seçilen spermlerle ICSI uygulaması yapılacak ve embriyo gelişimleri karşılaştırılacaktır. Hipotez; hangi sperm seçim yönteminin asthenoteratozoospermi vaka grubunda daha yararlı olduğu konusunda bir sonuca varılması ve seçilen bu spermler ile matür oositlere ICSI yapıldığında blastokist gelişimine etkisinin olup olmamasıdır. Çalışmada sınırlılıklar göz önünde

bulundurularak seçilen hasta grupları yumurta toplama - OPU (oosit-pick up) işlemine alınacak ve denüdasyon sonrası matürasyon tayini yapıldıktan sonra ICSI işlemi için her iki sperm seçim yöntemi kullanılarak spermler ayrıştırılacaktır. Bu deneyde kontrol grubu gradient yöntemi ile seçilmiş spermlerle ICSI yapılan oositlerdir. Oositler 2 gruba ayrılıp her iki sperm seçim yöntemi kullanılarak ayrıştırılan spermlerle ICSI yapılacak ve embriyo gelişimleri karşılaştırılacaktır.

Bu çalışmada gözlem: Asthenoteratozoospermi vakalarının semen analizi ile tespiti ve yapılan ICSI sonrası embriyo gelişimlerinin invert mikroskop ile 1.,2.,3.,4. ve 5 ila 5.5 gününe kadar saatlerine uygun olarak kontrol edilmesidir. Bağımsız değişkenler oosit kalitesi, boy ve kilodur. Bağımlı değişken ise asthenoteratozoospermi hastaları, en az 2 ve katları metafaz II oosit sayıları ve kadının yaşıdır.

Evren ve Örneklem

Bu çalışmanın evrenini Maltepe Üniversitesi Hastanesi ÜYTE Merkezine infertilite tedavisi için başvuran çiftlerden yalnızca asthenoteratozoospermi vakalarıyla ICSI işlemi yapılan çiftler oluşturmaktadır.

Çalışmanın standardize edilebilmesi için:

→Kadın yaşı 18-39 olan,

→Matür oosit sayısı ≥2 olan,

→Astenoteratozoospermik hastalar dahil edildi.

PGD vakaları ve hastaların Metefaz I oositlerinden gelişen embriyoları çalışmaya dahil edilmedi. Bu kriterlere uyan 22 hasta çalışmanın örneklemini oluşturdu.

Bu çalışmada; Asthenoteratozoospermi için total motilite <%40, progresif motilite <%32 ve morfoloji <%4 şeklinde tanımlandı. Bu çalışmada kardeş oositler 2 gruba ayrıldı, homojenize ejekülat 2 ye bölündü. Belirlenen kriterlere göre, DGS kullanılarak seçilen spermler ile ICSI ve mikroakışkan çip kullanılarak seçilen spermler ile ICSI olmak üzere iki alt gruba ayrıldı.

Veriler ve Toplanması

Çalışmaya Maltepe Üniversite Hastanesi Tüp Bebek Merkezine başvuran asthenoteratozoospermik ve kadın yaşı 38 den az 22 çift dahil edilmiştir. Çalışmada embriyo gelişimleri/kaliteleri 5 ila 5.5 güne kadar değerledirilmiş ve not edilmiştir. Çalışmanın sonunda toplanan veriler bilgisayar ortamına aktarıldı.

Verilerin Çözümlenmesi ve Yorumlanması

Çalışmada embriyolar, gelişimin 5 ila 5.5 gününe kadar her gün kontrol edildi, son durum değerlendirildi ve embriyoloji laboratuvar formu dolduruldu. Çalışma sonucunda yapılan değerlendirme ve karşılaştırmalar yorumlandı. Verilerin çözümlenmesi için Veriler R istatistiksel analiz programı ile analiz edildi ve veriler yorumlandı.

BÖLÜM 3. BULGULAR VE YORUMLAR

Bulgular

Bu çalışmaya Maltepe Üniversitesi Hastanesi ÜYTE Merkezine başvuran çiftlerden asthenoteratozoospermik erkek ve ≤38 yaşındaki yetişkin kadınlar olmak üzere 22 vaka dahil edildi. DGS kontrol grubu ve Mikroakışkan Çip deney grubu olarak belirlendi. Her vaka kendi içinde değerlendirildi, sonrasında 22 vaka birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme R istatistik paketi ile yapıldı, parametrik olanlar için student's t-testi, parametrik olmayanlar için Wilcox testi uygulandı ve p değeri <0.05 olarak kabul edildi. 22 vakanın istatistiksel analiz bulguları aşağıda belirtilmiştir. Grupların yaş ortalamaları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3: Grupların Yaş Ortalamaları

	Ortalama
Erkek Yaşı	37.27±5.16
Kadın Yaşı	32.55±4.68

Asthenoteratozoospermik vakalar DSÖ 2010 referans alınarak analiz edildi. 22 vakanın bazal değerlendirme semen parametreleri Tablo 4'te gösterilmiştir. Mikroakışkan Çip ve DGS yöntemleri arasındaki hacim, konsantrasyon, total motilite ve progresif motilite parametreleri kıyaslandı (Tablo 4).

Tablo 4: Semen Parametrelerinin Karşılaştırılması

Sperm Parametreleri

	Bazal	**Mikroçip**	**DGS**	**P Değeri***
Hacim (Ortalama)	3.18±1.48	1.07±0.15	0.73±0.08	P < 0.0001
Konsantrasyon (Ortalama)	40.63±42.00	4.37±6.05	19.80±19.90	P < 0.0001
% Total Motilite (Ortalama)	33.14±14.47	79.50±17.19	53.27±24.32	P < 0.0004
% Progresif Motilite (Ortalama)	12.59±8.33	68.41±24.57	31.73±19.90	P < 0.0001
Morfoloji (Ortalama)	1.50±0.67			

Mikroakışkan Çip yönteminde DGS yöntemine kıyasla düşük konsantrasyon gözlenmesine karşın, total motilite yüzdesinde mikroakışkan çip lehine anlamlı fark gözlendi (p=0.0004). Mikroakışkan Çip yönteminde progresif motilite yüzdesi DGS'ye göre çok daha yüksekti (p=0.0001).

Mikroakışkan Çip ile DGS yöntemlerinden seçilen spermlerin matür oositlere mikroenjeksiyonu sonrası embriyo gelişimleri gözlemlendi ve 1.gün-fertilizasyon, 3. gün toplam, 3. gün toplam G1 ,3. gün toplam G2, 5. gün toplam, 5. gün Çok iyi, 5. gün iyi, 5. gün orta, 5. gün düşük olmak üzere embriyo gelişimi her iki yöntem için kıyaslandı (Tablo 7). Blastokist sınıflandırması (Gardner & Schoolcraft, 1999) 'a göre kategorize edildi (Tablo 6). Embriyo gelişimleri Tablo 5'deki kriterler referans alınarak değerlendirildi.

Tablo 5: Embriyo Gelişimi ve Değerlendirilmesi (Veeck & Zaninovic, 2003)

Gelişim günleri	Kontrol saatleri	Kriterlere göre olması gereken kalite
1.GÜN	16-18	Nüklear Prekürsör Cisimcik sayısı ≤3 ve her iki Pronükleusta(PN) polarize, 2 Polar Cisimcik PN aksisinden en uzak polar cisimcik 50^0'den az
2.GÜN	26-42	2-4 Blastomerli, bölünme düzenli ve simetrik,<20 fragmantasyon
3.GÜN	66-72	6-8 Blastomerli, bölünme düzenli ve simetrik, <20 fragmantasyon
4.GÜN	90-100	12-16 hücre-morula ,
5.GÜN	114-120	İç Hücre Kitlesi sıkı paketlenmiş, çok sayıda hücre içeren ve Trofoektoderm hücreleri çok sayıda ve sıkı tutunmuş,Zona Pellucida incelmiş

Embriyo gelişimleri yukarıdaki tabloya uygun olarak takip edildi. Kontrol saatlerine uygun olarak hergün gelişim gözlemlendi ve not edildi.

Tablo 6: Blastokist Sınıflandırması (Gardner & Schoolcraft, 1999) 'dan uyarlandı.

Kategori	Blastokist Kalitesi
Çok İyi	5AA,4AA,3AA
İyi	5AB, 5BA, 4AB, 4BA, 3AB, 3BA
Orta	5BB, 4BB, 2AA, 2BB
Düşük	5AC,5BC,5CC,5CA,5CB,4AC,4BC,4CC,4CA,4CB,3BC,3CB,2BA,2AB, 2BB

İstatistiksel analiz için blastokist sınıflandırması kategorize edildi. Tablo 6'ya göre blastokistler karşılaştırıldı ve analiz edildi.

Tablo 7: Sperm Seçim Yöntemlerine Göre Embriyo Gelişimlerinin Karşılaştırılması

Embriyo Gelişim	Mikroçip	DGS	P Değeri
1.gün fertilize (Ortalama)	0.89±0.23	0.91±0.16	0.966
3. gün toplam (Ortalama)	0.85±0.26	0.83±0.25	0.570
3. gün toplam G1 (Ortalama)	0.83±0.25	0.76±0.31	0.625
3. gün toplam G2 (Ortalama)	0.12±0.23	0.13±0.21	0.933
5. gün toplam (Ortalama)	0.60±0.31	0.47±0.30	0.050
5. gün Çok iyi (Ortalama)	0.42±0.28	0.23±0.23	0.029*
5. gün iyi (Ortalama)	0.10±0.14	0.07±0.12	0.471
5. gün orta (Ortalama)	0.02±0.06	0.01±0.04	0.311
5. gün düşük (Ortalama)	0.07±0.11	0.16±0.19	0.104

Değerlendirme sonucunda Mikroakışkan Çip ile DGS yöntemleri kıyaslandığında fertilizasyon oranlarında anlamlı fark gözlenmedi (p=0.966). 3.güne gelişen toplam embriyo sayısında her iki yöntem karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi (p=0.570). 3. Gün Derece 1 - G1 ve Derece 2 - G2 embriyo gelişimi açısından anlamlı fark gözlenmedi (p=0625, 0.933). 5.gündeki toplam blastokist sayısı açısından anlamlı fark gözlenmedi ancak Mikroakışkan Çip yönteminden Dansite Gradient Santrifügasyon yöntemine kıyasla daha kaliteli blastokist geliştiği sonucuna varıldı (p=0.029, Tablo 7)

Yorumlar

Önceki çalışmalarda Mikroakışkan çip kullanıldığında daha verimli, iyi kalitede ve canlılıkta sperm izole edildiği gösterilmiş (Cho vd., 2003). Başka bir çalışmada rastgele vakalar çalışmaya dahil edilmiş ve kontrol grubuna kıyasla, mikroakışkan çip sonrası G1 embriyo sayısının daha yüksek olduğu gösterilmiş (Yetkinel vd., 2019). Diğer bir prospektif çalışmada mikroakışkan çip ve kontrol grubu olarak yüzdürme

tekniği ile izole edilen spermlerin kardeş oositlere mikroenjeksiyonu sonucu embriyo gelişim sürecine mikroakışkan çip sperm ayıklama yönteminin katkısı olmadığı bildirilmiş (Yalcinkaya Kalyan vd., 2019). Mikroakışkan çip sperm ayıklama yönteminin etkinliği spesifik asthenoteratozoospermi gruplarında aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada Fertile Ultimate mikroakışkan çipin, asthenoteratospermi vakalarında kullanılabilirliği gösterildi. Asthenoteratozoospermi vaka spermleri DGS ve mikroakışkan çip yöntemi ile seçildi ve kardeş oositlere mikroenjeksiyonu sağlandı. Diğer çalışmalara kıyasla fertilizasyonda ve gelişimin 3.gününde anlamlı fark bulunmasa da 5.günde blastokist kalitesi açısından anlamlı fark gözlendi ($p=0.029$).

Literatürde blastokist kalitesinin önemini vurguayan bir çalışmada, blastokist kalitesinin gebelik, hatta canlı doğum oranları ile anlamlı ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Zhao vd., 2018). Asthenoteratozoospermi vaka gruplarında mikroakışkan çip yönteminin blastokist kalitesine katkısı bu çalışmada gösterilmiş olsa da, sonucun güvenilirliği için çok merkezli ve daha fazla vaka sayısıyla çalışmanın tekrarlanması önerilmektedir.

BÖLÜM 4. SONUÇ

Özet

Ejekülattan başırılı sperm seçimi IVF başarısını etkileyen faktörler arasındadır. Sperm seçimi sırasında sperm hücrelerini olumsuz etkilediği belirtilen DGS yöntemine alternatif olarak mikroakışkan çip sperm ayıklama teknolojisi geliştirilmiştir. Birçok vakada etkinliği denenmiş olup, asthenoteratozoospermi vaka gruplarındaki etkinliği ve embriyo gelişimine katkısı yeterince aydınlatılmamıştır. Astehoteratozoospermi tanısıda DSÖ 2010 ve Kruger kriterleri referans alınarak progresif motilite <32 ve morfoloji <4 parametrelere sahip erkekler, 18-39 yaş aralığındaki kadınlar çalışmaya dahil edildi. Bu prospektif çalışmaya toplam 22 vaka katıldı ve her vaka kendi içinde 2 gruba ayrıldı, DGS ve mikroakışkan çip sperm seçim yöntemleri kullanılarak kardeş oositlere ICSI siklusu tamamlandı, embriyo gelişimleri not edildi. 22 vakanın embriyo gelişimleri değelendirildiğinde fertilizasyon, 3.gün G1 embriyo gelişimleri ve 5.gün toplam blastokist sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ancak asthenoterotozoospermi vaka spermlerinin DGS ve mikroakışkan çip yöntemleri ile mikroenjeksiyonu sonucunda ICSI siklusları arasında mikroakışkan çip lehine blastokist kalitesi açısından anlamlı fark gözlendi ve asthenoteratozoospermi vakalarında mikroakışkan çip yönteminin kullanılabilirliği gösterildi. Sonuç asthenoteratospermi vakaları için umut verici olsa da, vaka sayısı arttırılarak çalışmanın doğrulanması önerilmektedr.

Yargı

Son yıllarda seri santrifüjlemenin sperm üzerindeki olumsuz etkisi kanıtlanmıştır (Malvezzi ve diğerleri, 2014; Wang ve diğerleri, 2014; Fariello ve diğerleri, 2009). Bu durum YÜT'deki başarıyı da olumsuz etkilemektedir (Mascarenhas vd., 2012). Seri santrifjlemeye ek olarak mikroakışkan çip sperm ayıklma teknolojisi geliştirilmiştir. Sperm hücreleri santrifüje maruz kalmadan birbirleri ile yarışarak bitiş noktasına ulaşırlar ve santrifüjlemenin olumsuz etkilerine maruz kalmazlar. Literatürde mikroakışkan çip yöntemi ile ilgili çok sayıda yayın bulunmaktadır. Ancak mikroakışkan çip teknolojisi asthenoteratozoospermi vaka gruplarında etkinliği yeterince kanıtlanmamıştır. Bu çalışmada mikroakışkan çip yönteminin asthenoteratozoospermi vakalarına ve embriyo gelişimine etkisi gözlemlendi. Mikroakışkan çip yönteminde DGS

yöntemine kıyasla hazırlık sonrası konsantrasyonda yüksek oranda düşüş gözlendi. Konvansiyonel IVF yapılsaydı yöntemin yararı tartışılabilirdi ancak mikroenjeksiyon işleminde düşük konsantrasyonun önemsenmediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Sobek,1997).

Çalışmamın sonucunda mikroakışkan çip yöntemi asthenoteratozoospermilerde kullanıldığında blastokist kalitesine katkısı olduğu hakkında anlamlı sonuca varıldı (p=0.029) ve bu vaka gruplarına yararı olduğu gösterildi. Ancak mikroakışkan çiplerin yüksek maliyetinden dolayı çalışmaya 22 çift dahil edildi. Dolayısıyla vaka sayısının arttırılması ve farklı merkezlerde denenmesi sonucun güvenilirliğini arttıracaktır.

Öneriler

Asthenoteratozoospermi vakalarından mikroenjeksiyon işlemi için mikroakışkan çip sperm ayıklama yönteminin yararı göz önünde bulundurulduğunda, bu vaka grubu spermlerinin mikroakışkan çip yöntemi ile seçimi blastokist kalitesi açısında daha avantajlı olacaktır Literatürde mikroakışkan çip yönteminin rastgele vakalarda uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır. Çok merkezli ve yüksek hasta sayısı bulunan çalışmalar, çalışmanın güvenilirliği ve doğruluğunu arttıracaktır.

EK'LER

T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi: 28.11.2019
Toplantı Karar Sayısı: 2019/07
Toplantı Saati: 16:00

Karar No: 2019/07-14

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Çağla GÜLER tarafından gönderilen "Mikroakışkan Çip ve Gradient Yöntemiyle Seçilerek ICSI Yapılan Asthenoteratozoospermi Hasta Gruplarında Embriyo Kalitelerinin Karşılaştırılması" başlıklı tez önerisi ve ölçekleri 28.11.2019 tarihinde incelenerek T.C. Maltepe Üniversitesi Etik Kurulu Yönergesinin 6. maddesinde yazılı; **"Bilimsel disipline bağlılık, yaşama saygı, zarar vermeme, olası zarar ve riskler konusunda tüm ilgilileri bilgilendirme, insan ve topluma sorumluluk"** gibi ilkelere uygun olduğuna; yayına temel oluşturan araştırmanın tasarım, planlama ve yürütülme aşamalarında katkıda bulunanlara yer verilmesi, eksiksiz ve doğru kaynak gösterilmesi, gereken biçim ve doğrulukta atıflarda bulunulması kaydıyla yapılmasının etik olarak uygun olduğuna; toplantıya katılan üyelerin oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Belma AKŞİT
Etik Kurul Başkanı

Dr. Öğr. Üyesi İhsan GÜLAY
(Üye) (Katılmadı)

Prof. Dr. Nermin ÇELEN
(Üye)

Prof. Dr. Durmuş GÜNAY
(Üye)

Prof. Dr. Nurgün OKTİK
(Üye)

Prof. Dr. Zafer ÖZTEK
(Üye)

Prof. Dr. Necla ÖZTÜRK
(Üye)

Dr. Öğr. Üyesi Selcen ATAÇ
(Üye)

KAYNAKÇA

Akerlöf, E., Fredricson, B., Gustafsson, O., Lundin, A., Lunell, N. O., Nylund, L., Rosenborg, L., & Pousette, A. (1987). Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, *10*(5), 663-669. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00367.x

Alvarez Sedo, C., Rawe, V. Y., & Chemes, H. E. (2012). Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: Immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Human Reproduction*, *27*(7), 1912-1921. https://doi.org/10.1093/humrep/des126

Asghar, W., Velasco, V., Kingsley, J. L., Shoukat, M. S., Shafiee, H., Anchan, R. M., Mutter, G. L., Tüzel, E., & Demirci, U. (2014). Selection of Functional Human Sperm with Higher DNA Integrity and Fewer Reactive Oxygen Species. *Advanced Healthcare Materials*, *3*(10), 1671-1679. https://doi.org/10.1002/adhm.201400058

Asghari, A., Marashi, S.-A., & Ansari-Pour, N. (2017). A sperm-specific proteome-scale metabolic network model identifies non-glycolytic genes for energy deficiency in asthenozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *63*(2), 100-112. https://doi.org/10.1080/19396368.2016.1263367

Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, *22*(6), 1506-1512. https://doi.org/10.1093/humrep/dem046

Bulgurcuoğlu Kuran, S., & Altun, A. (2015). *Kaliteli spermin seçiminde güncel yöntemler (Derleme)*. *17*(62), 206-213.

Cellular aspects of in vitro fertilization (ultrastructural and cytogenetic studies of human gametes and zygotes). (1987). *Revisiones Sobre Biologia Celular: RBC*, *13*, V-X, 1-104.

Cho, B. S., Schuster, T. G., Zhu, X., Chang, D., Smith, G. D., & Takayama, S. (2003). Passively Driven Integrated Microfluidic System for Separation of Motile Sperm. *Analytical Chemistry*, *75*(7), 1671-1675. https://doi.org/10.1021/ac020579e

Cimadomo, D., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Ubaldi, N., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2018). Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 327. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00327

De Braekeleer, M., Nguyen, M. H., Morel, F., & Perrin, A. (2015). Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: A review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(4), 615-623. https://doi.org/10.1007/s10815-015-0433-2

Francavilla, S. (2001). Ultrastructural analysis of chromatin defects in testicular spermatids in azoospermic men submitted to TESE-ICSI. *Human Reproduction*, *16*(7), 1440-1448. https://doi.org/10.1093/humrep/16.7.1440

García-Vázquez, F., Gadea, J., Matás, C., & Holt, W. (2016). Importance of sperm morphology during their transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*, *0*(0), 0. https://doi.org/10.4103/1008-682X.186880

Gardner, D. K., & Schoolcraft, W. B. (1999). Culture and transfer of human blastocysts: *Current Opinion in Obstetrics and Gynaecology*, *11*(3), 307-311. https://doi.org/10.1097/00001703-199906000-00013

Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, *21*(4), 411-426. https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016

Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., & Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, *49*(1), 112-117. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59660-5

Kupker, W., Schulze, W., & Diedrich, K. (1998). Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: The significance of sperm morphology. *Human Reproduction*, *13*(suppl 1), 99-106. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.99

Le Lannou, D., & Blanchard, Y. (1988). Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *Reproduction*, *84*(2), 551-556. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840551

Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, *9*(12), e1001356. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356

Menkveld, R., Stander, F. S. H., Kotze, T. J. vW., Kruger, T. F., & Zyl, J. A. van. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, *5*(5), 586-592. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137150

Morelli, S. S., Seungdamrong, A., McCulloh, D. H., & McGovern, P. G. (2010). Abnormal sperm count and motility on semen analysis are not sufficiently predictive of abnormal Kruger morphology. *Fertility and Sterility*, *94*(7), 2882-2884. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.061

Morgante, G., Scolaro, V., Tosti, C., Di Sabatino, A., Piomboni, P., & De Leo, V. (2010). [Treatment with carnitine, acetyl carnitine, L-arginine and ginseng improves sperm motility and sexual health in men with asthenopermia]. *Minerva Urologica E Nefrologica = The Italian Journal of Urology and Nephrology*, *62*(3), 213-218.

Quinn, M. M., Jalalian, L., Ribeiro, S., Ona, K., Demirci, U., Cedars, M. I., & Rosen, M. P. (2018). Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Human Reproduction*, *33*(8), 1388-1393. https://doi.org/10.1093/humrep/dey239

Sepúlveda, B., Arias, M. E., Aguila, L., Zambrano, F., Sánchez, R., & Felmer, R. (2018). Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? *Andrologia*, *50*(3), e12921. https://doi.org/10.1111/and.12921

Sobek, A., Hrbková, K., & Tesarová, M. (1997). [The current role of intracytoplasmic single sperm injection (ICSI) in assisted reproduction]. *Ceska Gynekologie*, *62*(5), 270-273.

Suarez, S. S., & Wu, M. (2016). Microfluidic devices for the study of sperm migration. *Molecular Human Reproduction*, molehr;gaw039v3. https://doi.org/10.1093/molehr/gaw039

Tang, L., Rao, M., Yang, W., Yao, Y., Luo, Q., Lu, L., Wang, L., & Zhao, S. (2020). Predictive value of the sperm DNA fragmentation index for low or failed IVF fertilization in men with mild-to-moderate asthenozoospermia. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 101868. https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101868

van der Westerlaken, L., Helmerhorst, F., Dieben, S., & Naaktgeboren, N. (2005). Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, *83*(3), 612-617. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.08.029

Veeck, L. L., & Zaninovic, N. (Ed.). (2003). *An atlas of human blastocysts*. Parthenon Pub. Group.

Verheyen, G., Tournaye, H., Staessen, C., De Vos, A., Vandervorst, M., & Van Steirteghem, A. (1999). Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Human Reproduction*, *14*(9), 2313-2319. https://doi.org/10.1093/humrep/14.9.2313

Winters, B. R., & Walsh, T. J. (2014). The Epidemiology of Male Infertility. *Urologic Clinics of North America*, *41*(1), 195-204. https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.006

World Health Organization (Ed.). (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th ed). World Health Organization.

Yalcinkaya Kalyan, E., Can Celik, S., Okan, O., Akdeniz, G., Karabulut, S., & Caliskan, E. (2019). Does a microfluidic chip for sperm sorting have a positive add-on effect on laboratory and clinical outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles? A sibling oocyte study. *Andrologia*, *51*(10). https://doi.org/10.1111/and.13403

Yetkinel, S., Kilicdag, E. B., Aytac, P. C., Haydardedeoglu, B., Simsek, E., & Cok, T. (2019). Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility: A prospective, randomized controlled trial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *36*(3), 403-409. https://doi.org/10.1007/s10815-018-1375-2

Zhao, Y.-Y., Yu, Y., & Zhang, X.-W. (2018). Overall Blastocyst Quality, Trophectoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer Cycles: *Chinese Medical Journal*, *131*(11), 1261-1267. https://doi.org/10.4103/0366-6999.232808

Zini, A., Finelli, A., Phang, D., & Jarvi, K. (2000). Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*, *56*(6), 1081-1084. https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00770-6