

T.C.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİ SPERM SEÇME TEKNİĞİ OLAN MİKROÇİP YÖNTEMİNİN EMBRİYO
KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

ÖZCAN DÜZCÜ

DANIŞMAN

PROF.DR. ERSİ KALFOĞLU

2.DANIŞMAN

PROF. DR. TÜLAY İREZ

İSTANBUL-2018

T.C.
YENİ YÜZYIL Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Savunma Tarihi: 28/08/2018

Prof. Dr. Ersi Kalfoğlu

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışman

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Tülay İrez

Biruni Üniversitesi

2.Danışman

Üye

Dr.Öğr.Üyesi Nurten Dayıoğlu
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. İmer Okar
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Melike Erkan
İstanbul Üniversitesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ÖZCAN DÜZCÜ

İTHAF

Sevgili Ođlum Doruk DÜZCÜ'ye ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini paylaşan, değerli danışmanım sayın Prof.Dr.Ersi KALFOĞLU'na, işe başladığım günden beri bana yardımcı olan, derin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Bülent TIRAŞ'a, yüksek lisans tezimi yazarken bana yardımlarını hiç esirgemeyen, süreçle ilgili tüm sıkıntılarında yanımda olan, bana sabırla katlanan, çok kıymetli hocam Prof. Dr. Tülay İREZ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Data girişlerinde yardımını esirgemeyen Aykut ÖZCAN arkadaşşıma, yüksek lisans eğitimimde tanıştığım ve desteğini hep üzerimde hissettiğim Emb. Ali BURAN'a, eğitimime başladığım ilk günden beri bana her konuda yardımcı olan ve manevi gücü bana hissettiren çok kıymetli babam Hasan DÜZCÜ'ye çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana maddi, manevi destek olan annem Betül DÜZCÜ'ye ve Münevver GÜR'e, sabrı ve desteği için sevgili eşim Tuba DÜZCÜ'ye çok teşekkür ederim.

Bu alışma, Acıbadem Üniversitesi Maslak IVF Merkezi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	I
BEYAN	II
İTHAF	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XII
ABSTRACT	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Semen Analizi.....	3
2.2 Sperm Morfolojisinin İncelenmesi.....	4
2.3 Sperm Hazırlamada Yoğunluk Sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi.....	6
2.4. Mikroakışkan Yöntemi İle Sperm İzolasyonu.....	9
2.5. ICSI Uygulaması Ve Embriyo Takibi.....	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	11
3.1. Mikroakışkan Sperm Sıralama Çip.....	11
3.2. İstatistiksel Analiz.....	12
3.3.Kullanılan Malzemeler.....	12
4. BULGULAR	14
5. TARTIŞMA	16
6. SONUÇ	19
7. KAYNAKLAR	20
8. ETİK KURUL KARARI.....	24

9.ÖZGEÇMİŞ	26
------------------	----

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Semen Analizinde Standard Değerler Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010).....	5
Tablo2: ÇalışmadaKullanılan Malzemeler.....	13
Tablo 3: Grupların Özellikleri.....	14
Tablo 4: Sperm Oosit Özellikleri ve Embriyo Gelişimi.....	15
Tablo 5: Sperm Seęimi Gruplarında Gebelik Durumu	16

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Neubauer Kamerasında Sayma Alanları	3
Şekil 2: Kruger Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi.....	4
Şekil 3: Sperm Hazırlamada Gradient Ve Swim Up Yöntemi.....	7
Şekil 4: Mikroakışkan Yöntemi İle Oluşturulmuş Lam Tasarımı.....	9

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Alpha	: Alpha Derneği
ART	: Assisted Reproductive Techniques
ASRM	: American Society for Reproductive Medicine
DGS	: Dansite Gradyent santrifügasyon
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTT	: Dithiothreitol
ESHRE	: European Society of Reproductive Medicine
FISH	: Fluoresan in situ hibridizasyon
g	: Santrifüj kuvveti
Gradient	: Yoğunluk sıralayıcısı
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonic acid)
HSA	: Human Serum Albumin
HTF	: Human tubal fluid (insan tuba sıvısı)
ICSI	: İntra stoplazmik sperm injeksiyonu
IUI	: İntrauterin inseminasyon
IVF	: İnvitro fertilizasyon
MACS	: Magnetic Activated Cell Sorting
Pure gradient	: Saf gradient
PVP	: Polyvinylpyrrolidon
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Santrifüj devri sayısı
Sperm Buffer	: 5mg/ml HSA içeren HEPES ile tamponlanmış sperm kültür mediumu.
Swim up	: Yüzdürme

TPMSS	: Total progresif motil sperm sayısı
Tris	: Trishydroxymethylaminomethane
Vitalite	: Canlılık
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri

ÖZET

Düzcü, Ö. Yeni Sperm Seçme Tekniği Olan Mikroçip Yönteminin Embriyo Kalitesi Üzerine Etkisi, Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji Programı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2018.

Genel Bilgiler ve Amaç; ICSI uygulamalarında kullanılan spermlerin DNA bütünlüğü çok önemlidir. Bu amaçla çeşitli sperm izolasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Swim-up ve yoğunluk gradient yöntemi bunlardan biridir. Son yıllarda spermleri fizyolojilerine göre ayıran bir yöntem olan mikroakışkan çip yönteminin klinik sonuçları henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada mikroakışkan çip yöntemi ile ayrılmış spermlerin ICSI sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada erkek faktörü olan 290 ICSI olgusunun gradient (100) ve mikroakışkan çip (190) sperm seçimi uygulanmış ve gebelik sonuçları elde edilmiştir. Olguların bazal hormon düzeyleri kaydedilmiş, semen analizi WHO 2010 kriterlerine göre yapılmıştır. İstatistik değerlendirme SPSS 20 istatistik paketi yardımı ile yapılmış, student's T-testi uygulanmıştır. p değeri <0,05 ise anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: Mikroakışkan çip yöntemi ile sperm izolasyonunun yoğunluk sıralayıcısı (dansite gradient) yöntemine göre daha fazla sayıda blast aşamasında normal embriyo (p=0,005), daha fazla sayıda 3. günde duraklamış embriyo geliştirdiği (p=0,002) ve daha yüksek oranda gebelik elde edilmediği görülmüştür (p=0,342).

Tartışma: Mikroakışkan çip yönteminin klinik başarısının çok merkezli ve farklı hasta gruplarında denenmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: ICSI, sperm seçimi, swim up, gradient sıralama, mikroçip.

ABSTRACT:

Duzcu, O. The Effect of Microchip Method in which Newly Developed Sperm Selection Technique on Embryo Quality. Yeni Yuzyil University Medical Sciences Institute, Clinical Embryology Program. Master's Thesis, İstanbul, 2018.

Aim of the Study and Purpose: DNA integrity of sperm used in ICSI applications is very important. For this purpose various sperm isolation methods have been developed. Swim-up and density gradient method are two of them. Clinical results of microfluidic chip method, which is a method which differentiates according to sperm physiology in years, has not yet been fully elucidated. For this reason, it is aimed to investigate ICSI results of sperm separated by microfluidic chip method in this study.

Material and Methods: In this study, gradient (100) and microfluidic chip (187) sperm selection were applied to the male factor 290 ICSI case and pregnancy results were obtained. Baseline hormone levels of the cases were recorded and seminal analysis was performed according to WHO 2010 criteria. Statistical evaluation was performed with the help of SPSS 20 statistical package and student's T-test was applied. A p value <0.05 was considered significant.

Results and Discussion: The microfluidic chip method showed more embryos at the blast stage ($p = 0,005$), more arrested embryos at the blast stage ($p = 0,002$), and no higher pregnancy rate than the density gradient method of sperm isolation ($p = 0.342$). It is recommended to evaluate the clinical success of the microfluidic chip method in multicenter and different patient groups and to evaluate the results

Key Words: ICSI, sperm selection, swim up, gradient sorting, microchip.

1. GİRİŞ

Yardımla üreme yöntemlerinin yaygın olarak kullanılmasına rağmen, canlı doğum oranları hala istenilen seviyede olmadığı bilinmektedir (1). Günümüzde spermin sadece erkek genlerini embriyoya nakletmek gibi bir işlevi olmadığı, fertilizasyonun erken aşamaları, implantasyon ve daha ileri yaşam evrelerinde de etkilerinin olduğu gösterilmektedir (2,3). Yardımla üreme yöntemi kullanılan tedavi döngülerinde başarının sağlanması kaliteli gametlerin seçilmesi ile mümkün olmaktadır. İyi kaliteli spermin seçiminde, hala klasik yöntemler kullanıldığı gibi çok gelişmiş yeni yöntemler de mevcuttur. Rutin sperm hazırlama tekniklerinden olan dansite gradyent santrifügasyon (DGS) ve yüzdürme yöntemleri (swim-up) hali hazırda yardımla üreme işlemlerinde kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde sperm, sedimentasyon ya da migrasyon temeline dayanarak seçilmektedir (4). Bu yöntemlerle spermin motilite ve morfoloji özelliklerine göre seçim yapılmaktadır (5). Bununla birlikte bu yöntemler ile spermin DNA bütünlüğü, kromatin kondansasyonu, apoptotik özellikleri, ultra morfolojik yapısı gibi özellikleri tespit edilememektedir. İnfertilite tedavisi sırasında bu özelliklerin belirlenerek sperm seçiminin gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bütün bu nedenlerle yeni sperm seçim yöntemlerinin geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır.

İleri erkek faktörlü olgularda ICSI uygulaması yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat DNA hasarlı sperm kullanıldığında sadece fertilizasyon değil, embriyo gelişimi, implantasyon ve gebelik oranları düşmekte, abort oranları artmakta ve doğan bebeklerde ciddi genetik sorunlar gözlenebilmektedir (6-9). Yardımla üreme teknolojisi başarı oranları son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Ancak, büyük ilerlemelere rağmen, YÜT tedavileri hala %50 başarı oranlarının üzerine çıkamamaktadır. Erkek faktörlü olgularda YÜT'nin başarısındaki gelişmeler sperm kalitesi ile yakından ilişkilidir. Sperm anormalliği, düşük sperm sayısı ve motilite, sperm hücrelerinin oositi dölleme yeteneğini bozmaktadır (10). Bu nedenle, fonksiyonel olarak normal sperm için yeni seçim araçlarının tasarımı, YÜT tedavisi sırasında fertilizasyon ve hamilelik olasılığını arttırmak için uygun bir strateji olabilmektedir.

Sperm seçiminde ana amaç, nükleer anormallikler ve DNA hasarı ile spermatozoa yüzdesini önemli ölçüde azaltarak; canlı, hareketli ve morfolojik olarak sağlam olan spermleri seçmektir. Yüzdürme ve dansite gradyan santrifüjleme teknikleri de dahil olmak üzere geleneksel sperm seçim teknikleri, YÜT tedavisi sırasında sperm seçimi için en yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüzdürme metodu, düşük yoğunluklu bir hareketli sperm üretirken, gradyan yoğunluklu santrifüjleme tekniği, yoğunluğuna bağlı olarak sperm hücrelerini seçebilmektedir. Bununla birlikte, santrifüjleme sperm canlılığı üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir ve sperm DNA fragmentasyonu ile sonuçlanabildiği ileri sürülmektedir (11). Önceki çalışmalar, dansite gradyan santrifüjünün, DNA hasarı ve DNA fragmentasyonu ile sperm yüzdesini önemli ölçüde azalttığını ve daha yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip daha canlı sperm seçimine yol açtığını bildirmiştir, ancak normal kromatin kondansasyonlu sperm yüzdesi, yüzdükten sonra önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmektedir (12-15). Son yıllardaki çalışmalar, yoğunluk gradyan santrifüjleme tekniklerinin kullanımının, sperm DNA fragmentasyonunu azaltmadığını bildirmektedir (11). İşlevsel olarak normal sperm seçiminde hangi yöntemin üstün olduğu konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır. İleri sperm seçim tekniklerinin geliştirilmesi ile yüksek DNA bütünlüğüne sahip olan, maturasyonu yüksek ve yapısal olarak sağlam sperm seçilme şansını artırabileceği düşünülmektedir.

Mikroakışkanlar, çeşitli araştırma alanlarında ve klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmakta ve YÜT'ü geliştirmek için alternatif bir sperm sıralama yöntemi olarak uygulanabilmektedir. Mikroakışkan sperm sıralama çipinin temel düşüncesi, fertilizasyon ve gebelik olasılığını artırmak için en hareketli ve fonksiyonel olarak normal spermi toplamaktır. Bununla birlikte, mikro-akışkan sperm seçiminin YÜT döngülerinde gebelik sonuçları üzerindeki etkisini değerlendirmek için yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu retrospektif çalışma, spermatozoaların geleneksel gradyan temelli santrifüj tekniği veya mikroakışkan sperm seçimi kullanılarak seçildiği durumda YÜT sikluslarının klinik sonucunu değerlendirmek için tasarlanmıştır.

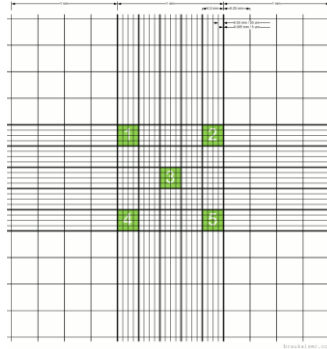
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Semen Analizi

Dünya Sağlık Örgütü'nün önerisine göre bir erkeğin semen profiline karar vermek için her biri arasında 7 günden az ve 3 haftadan uzun olmamak üzere en az 2 örnek incelenmelidir. Örnekler alınmadan önce erkek 48 saatten kısa ve 7 günden uzun olmamak üzere cinsel perhizli olmalıdır. Yapılan bu analizler sonuçlarına bakıldığında çok fazla fark olursa analizler tekrarlanmalıdır (15).

Sperm Dansitesi/Konsantrasyonu Ölçümü; Hemositometrik Yöntem

10 µl semene 190 µl distile su veya metilen mavisi ile (%1-2) karıştırılmış %1 formalin koyulur. 2-3 dakika yerleşmesi beklenir ve merkezdeki karelerden 5 kare (4 köşe 1 merkez) sayılır (Şekil 1). Sayılan hücre $\times 10^6$ = sperm konsantrasyonu/ml bulunur. WHO 2010 kriterlerine göre semende bulunan spermlerin konsantrasyonlarının ölçümünde hemositometrik yöntemin tercih edilmesi önerilmektedir (15).



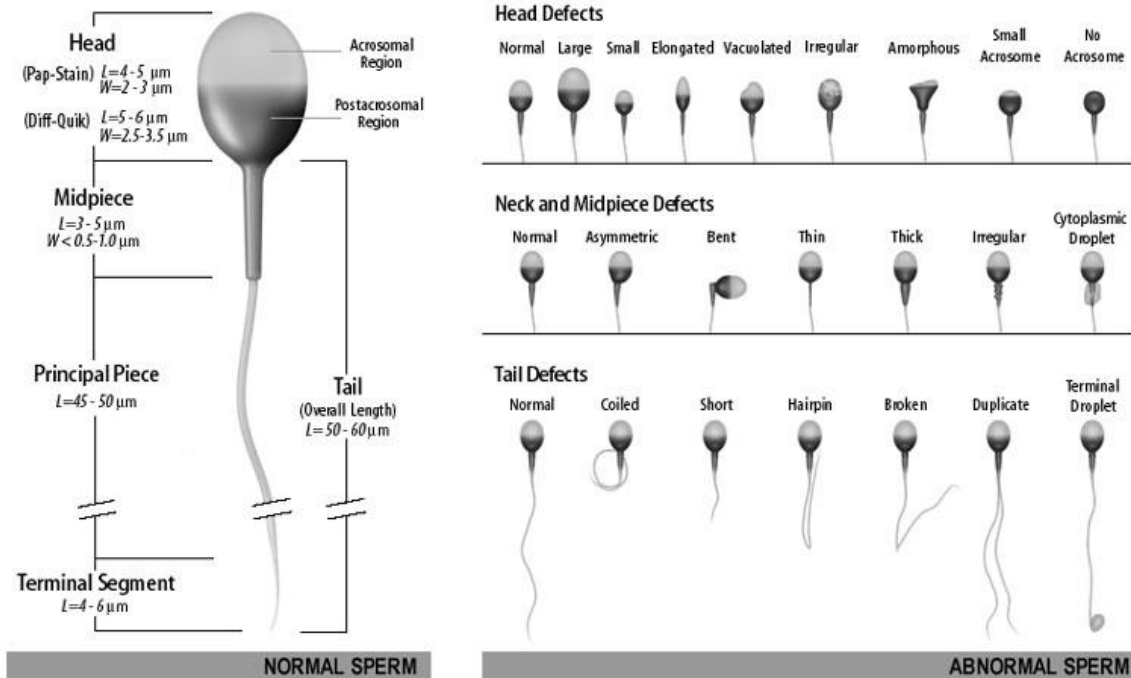
Şekil 1: Neubauer Kamerasında Sayma Alanları

2.2 Sperm Morfolojisinin İncelenmesi

Kruger Kriterlerine Dayalı Morfolojik (Şekilsel) Değerlendirme (WHO,2010) (15)

Şekil 2'de görüldüğü gibi, normal ve normale yakın morfolojiye sahip sperm hücrelerinin seçilmesi, infertilite tedavisinde son derece önemlidir. Semen'in morfolojik değerlendirmesinde Kruger kriterleri göz önünde bulundurulmaktadır. Bu kriterler ile baş, akrozom, çekirdek, boyun, kuyruk ve orta parça anormalikleri değerlendirilmektedir (16,17). Diff quick, hematoxylin veya Giemsa boyaları ile boyanan spermier immersion yağı ile 100x objektifde incelenir, akrozom ve nukleus anomalileri ile orta kısım ve kuyruk anomalileri sayılır, yaklaşık 200 sperm sayılarak normal morfoloji oranı elde edilir. 2010 Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre % 4 ve üzeri normal sperm taşıyan semen örnekleri morfolojik olarak normal kabul edilir.

Spermierin Morfolojik Olarak Değerlendirmesinin Diff Quick Boya İle Boyanma Prosedürü (WHO 2010)(15)



Şekil:2 Kruger Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi (15)

Semen örneği homojenize edildikten sonra 20 mikrolitresi lam'a ince bir film tabakası şeklinde yayılır ve oda ısısında kurumaya bırakılır. İyice kuruduktan sonra sırası ile;

1. Fiksatif 15 saniye
2. Hızlı boyama çözeltilisi 1 10 saniye
3. Hızlı boyama çözeltilisi 2 5 saniye

4. Akan musluk suyunda fazla boyayı atmak için lam tersinden 10–15 kez yıkanır.

Her aşamada lamlar emici filtre kâğıdı üzerine dikilerek fazla çözeltili akıtılır. En son aşamada'da musluk suyunda yıkandıktan sonrada emici filtre kağıdı üzerine dikilerek fazla suyun akması ve oda ısısında kuruması sağlanır.

Boya Setinde Bulunan Reaktifler

1. Diff-Quik Hızlı Boyama Kiti İçindekiler:

- a) Fiksatif reaktifi (metanol içinde çözülmüş triarilmetan boyası);
- b) Boyama çözeltilisi 1 (eozinofilik ksanten)
- c) Boyama çözeltilisi 2 (bazofilik tiazin).

2. *Fiksatif*: 1000 ml % 95'lik metanolde çözülmüş 1,8 mg tirarilmetan (isteğe bağlı olarak ilave edilir).

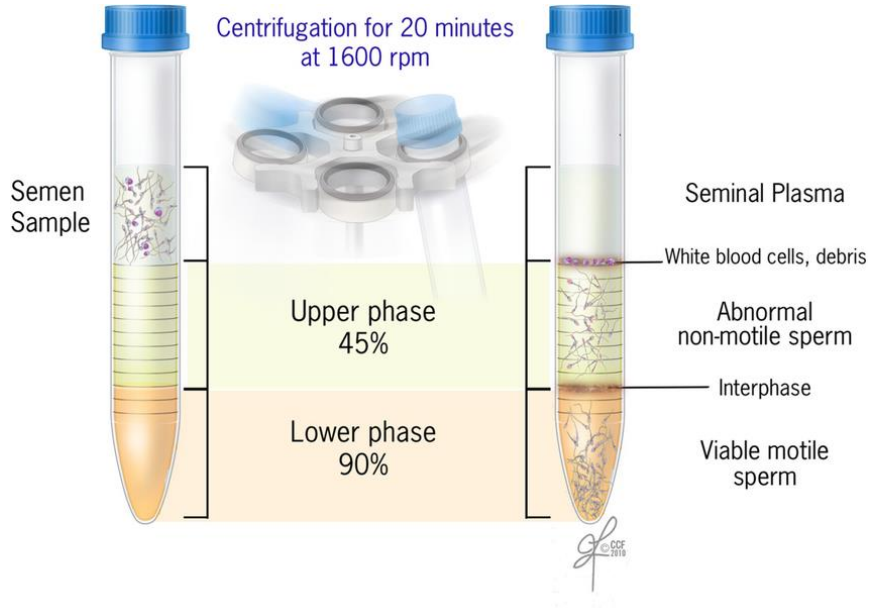
Tablo 1: Semen Analizi Referans Deđerleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) (15)

Semen Parametresi	En düşük Referans
Semen volumü (ml)	1.5
Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	15
Total sperm sayısı (10^6 /ejakülat)	39
Progressive motilite (PR, %)	32
Total motilite (PR +NP, %)	40
Vitalite (canlı sperm, %)	58
Sperm morfolojisi (NF, %)	>4
pH*	>=7.2
Lökosit* (10^6 /ml)	<1

2.3 Sperm Hazırlamada Yoğunluk Sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi

Anormal spermiler ile ölü hücrelerin ara fazlarda kalabilmesi ve normal hareketli spermilerin dibe çökmesi prensipine dayanmaktadır. Gradient PVP ve silika partikülleri içeren sperm için fizyolojik sayılabilecek bir solüsyonda hazırlanmış değişik yoğunluktaki preparatlardır. Tabakalar hazırlanırken en yoğun olan her zaman en allta olacağından normal spermde santrifüj sırasında bu en yoğun tabakaya göç eder ve sediment oluşturmaktadır. Semende bulunan diğer bileşenler ve anormal spermiler yoğunluk farkından dolayı üstte kalır ve böylece sağlıklı sperm ejakulattan ayrılmış olmaktadır. Gradient yöntemi semende hareketli sperm/toplam sayı oranının düşük olduğu, sperm dışı hücre sayısının yüksek olduğu durumlarda ve teratozoospermi olgularında özellikle kullanılmaktadır. Rutin kullanımda iki tabakalı gradient kullanımı yeterli olmaktadır. Gradient yöntemi mutlaka konik tabanlı tüp kullanarak yapılmalıdır. Gradientten süzülen sperm konik tüpün tabanında oluşturacağı çökelti böylece gözlenmektedir.

Hastadan alınan örnek 60 dakika kadar oda ısısında sivilaşmaya bırakılır. Semen bulunduğü kabın ağzı açık olmamalıdır. Bu süre zarfında arada sırada kap çalkalanıp ışığa tutularak sivilaşıp sivilaşımadığı gözlenmelidir. Ejakulat tamamen sıvı hale gelmelidir ve içersinde lifimsi partüküller izlenmemelidir. Eğer 60 dakika süresinde sivilaşma olmadıysa dereceli pipet ile ejakulat yavaşça çekilip bırakılarak sivilaşmasına yardımcı olunabilir. Ejakulat bu işlemlere rağmen sivilaşımadıysa inkübatörde biraz bekletmek sivilaşmayı kolaylaştırabilir. Bazen eğer ejakulat çok viskoz ise sivilaşmayabilir. Böyle durumlarda ise ejakulat kabına bir miktar HEPES ya da bikarbonat tamponlu medium eklenerek büyük hacimli pipetle pipetleme işlemi tekrardan yapılabilir. Ejekulat'tan 2-3 ml gradyen katmanlarının üzerine yavaşça konur ve 1500-2000 rpm de 10-15 dakika santrifüjlenir. Üst faz ve ara faz atılır, dipte kalan çökelti bırakılır. Çökelti üzerine 2 ml HTF solüsyonu koyularak santrifüjleme işlemi tekrarlanır. Bu işlem iki kez yapılır. Yıkamış spermilerin üzerine 0.5 ml HTF solüsyonu koyularak sperm süspansiyonu elde edilir.



Şekil 3. Sperm Hazırlamada Gradient Yönteminin Çizim İle Gösterilmesi (18)

Kullanılan Mediumlar: Dansite gradient yönteminde genellikle iki tabakalı gradient tekniği uygulanır. %45'lik ve %90'lık dan oluşan 1 ml'lik iki tabakalı sistem (her biri 0.5ml hacimli) hazırlanır. Üst tabakayı %45'lik, alt tabakayı ise %90'lık saf gradient oluşturur.

Gradientler uygulama günü hazırlanır. %100'lük saf gradientten dilüsyonlar hazırlanmadan önce +4°C'den çıkarılır, kullanılacak miktarda alınarak, steril falcon konik (Falcon 2095) tüplere bölünür ve oda sıcaklığına avuç içine alınarak gelmesi sağlanır. Oda sıcaklığına gelen puregradient 0.22µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilir. Dilüsyonlar Sperm Buffer (AllGrad Wash) kullanılarak yapılır.

Sperm Buffer: 5mg/ml HSA içeren Hepes ile tamponlanmış kültür mediumu. Albumin spermatozoayı reaktif oksijen türevlerinden korurken, Hepes atmosferik ortamda pH'yı işlem için uygun değerde tutmaya yarar. AllGrad Wash (LifeGlobal) bu işlem için kullanılmaktadır.

Saf Gradient (Pure Gradient): %100'lük stok AllGrad (LifeGlobal) kullanılmaktadır.

Gradient'in Hazırlanması: Dilüsyon miktarları günlük olarak hasta sayısına ve yapılan işleme göre hesaplanmaktadır. Genellikle ejakülat örnekleri iki tüpe eşit bölünerek işleme alınır. Bu nedenle hasta başına en az 2ml'lik dilüsyonların yapılması gerekmektedir.

Üst Tabaka: %45 'lik tabaka, 4,5ml'lik %100'lük stok PureGradient ile 5.5 ml Sperm Buffer (AllGrad Wash) karıştırılır.

Alt Tabaka: %90 'lık tabaka, 9ml'lik %100'lük stok PureGradient ile 1ml Sperm Buffer (AllGrad Wash) karıştırılır.

Uygulama: Hastanın örneğinin hazırlanmasında kullanılan tüm tüpler en az iki belirtecin olduğu etiketler ile etiketlenmelidir (Örn: hasta protokol numarası, hastanın adı-soyadı).

Hasta örneği iki tüpe konur, her tüp üzerine 1'er ml yıkama solüsyonu konularak homojen hale getirilir. Bu süspansiyon, daha önce 5 ml (Falcon 2003) tüplerde 0,5'er ml olarak hazırlanmış iki katmanlı Pure Sperm gradienti üzerine yavaş yavaş bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirilir. Spermatozoanın kaç gradient PureSperm'e maruz bırakılacağına şu kriterlere göre karar verilir:

Tekli Gradient (%80): Total sperm sayısı $<1 \times 10^6$

İkili Gradient (Aşağıdan yukarıya %90, %45): Total sperm sayısı $1-5 \times 10^6$ arasında ise

Üçlü Gradient (Aşağıdan yukarıya %90, %70, %50): Total sperm sayısı $>5 \times 10^6$ veya çok fazla debri içeriyorsa 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Bir pastör pipeti kullanılarak en aşağıda bulunan %90'lık PureSperm tabakasına ulaşılır. Bu tabakaya pipet ile girildiği anda bir hava kabarcığı verilir. Böylece %90'lık Percoll tabakasının seçtiği kısma, üst tabakalardan herhangi bir karışma olması engellenmiş olur. Tüpün zemininden pellet ve gradient (%90) birlikte 0.2-0.4 ml kadar aspire edilir, 4 ml sperm yıkama mediumu içeren (Falcon 2095) tüpe aktarılır. Aynı işlem diğer tüp için de yapılır. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilir. Supernatant (Falcon 2001) tüp içine ayrılır, bu tüp atılır. Her iki tüpe 4'er ml sperm yıkama mediumu eklenir. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilir. Supernatant (Falcon 2001) tüp içine alınır, bu tüp atılır.

Pellet 500 µl sperm yıkama mediumu ile resüspanse edilir. 30 dakikalık inkübasyondan sonra intra uterin inseminasyon için kullanılır.

Yıkama Solüsyonlarının Hazırlanması: Likefaksiyon sonrası örnek Sperm Buffer ile karıştırılarak homojenize edilir. Sperm Buffer +2-8 °C 'de buzdolabında tutulur ve işlemden bir gün evvel vaka başına yaklaşık 10ml olacak şekilde 25 cm² flaslara (Falcon 353014) konur ve 37 °C'ye ısınması için ağzı kapalı şekilde inkübatöre kaldırılır.

Sperm Buffer: 5mg/ml HSA içeren Hepes ile tamponlanmış kültür mediumu. Albumin spermatazoayı reaktif oksijen türevlerinden korurken, Hepes atmosferik ortamda pH' ı işlem için uygun değerde tutmaya yarar. AllGrad Wash (LifeGlobal) bu işlem için kullanılmaktadır.

2.4. Mikroakışkan Yöntemi İle Sperm İzolasyonu

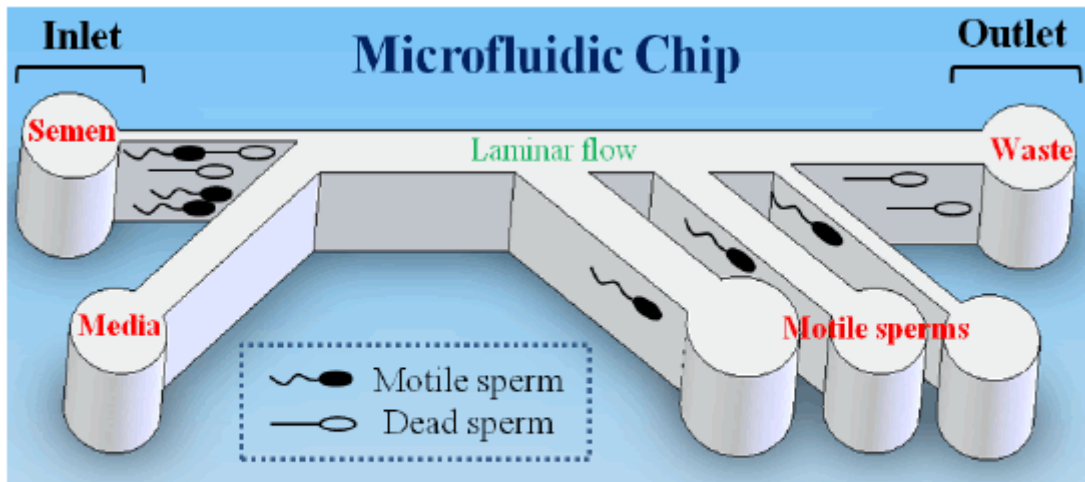


Figure 2: The schematics of multiple channel microfluidic chip. The motile sperms would be sorted either with random swimming direction by laminar flow.

Şekil. 4. Mikroakışkan Yöntemi İle Oluşturulmuş Lam Tasarımı (19)

Mikroakışkan sıralama (SCMS) sistemi şemada gösterilmiştir. Şekil 4' de görüldüğü gibi, mikroçip etkili sperm sıralama için farklı kanal uzunluklarına sahiptir. Kanal girişleri ve çıkışları için ölçek çubukları 1 cm' dir. Hareketli normal spermier toplanarak ICSI için kullanılmaktadır.

2.5. ICSI Uygulaması Ve Embriyo Takibi

ICSI işlemi inverted mikroskoba adapte edilmiş Hoffman modülasyonu kullanılarak 37°C 'de X 400 büyütme kullanılarak yapılmaktadır. ICSI petrisi önceden hazırlanarak 37°C 'de ICSI kabı içerisinde ve yine mikroskop ve tutucu ve enjeksiyon pipetleri manuel olarak kullanılarak mikroskop tablasında gerçekleştirilmektedir. Hepes tamponlu ICSI mediumu bu amaçla kullanılmaktadır.

Mikroenjeksiyon işleminde morfolojik olarak normal görünümlü motil spermeler seçilir. Seçilen spermeler, ICSI pipeti kullanılarak PVP içerisinde spermelerin kuyruk kısmı hasarlanarak immobilize edilir. Daha sonra herbir sperm hücresi oosit stoplazması içerisine enjekte edilir. Fertilizasyon ve embriyoların değerlendirilmesi ASRM, ESHRE ve ALPHA kriterlerine göre yapılır (20).

Mikroenjeksiyon işleminden sonra birinci gün sabahı 16-18 saatlerde döllenme kontrolleri yapılır. Embriyolar transfer edilecekleri ya da dondurulacakları güne kadar 4.gün hariç diğer günler kontrol edilir. Embriyoların ilk 3 günlük gelişimlerinden fertilizasyon, 2.gün, 3. gün ve 5. gün embriyo değerlendirmeleri blastomer parlaklığı, eşitliği ve fragmantasyon durumuna göre yapılır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Acıbadem Maslak Hastanesi IVF Merkezine başvuran ve 2016-2018 yıllarında ICSI uygulanan 200 erkek infertilite tanılı çiftin ICSI uygulamasında standart dansite gradient ve mikroakışkan yöntem ile seçilmiş spermlerin kullanılmasında embriyo gelişim ve gebelik oranları retrospektif olarak incelenmiştir. Çalışma Acıbadem Üniversitesi Etik Kurulu tarafından kabul edilmiştir (2018-8/1).

Çalışmada semen analizleri WHO 2010 kriterlerine göre uygulanmıştır (15). Semen örneklerinin hazırlanması sırasında 20 µl'lik yaymalar yapılarak bir preparat alkolde fikse edilmiş, alkolde fikse edilmiş preparat Diff Quick boyası ile boyanmıştır. Diff quick sonuçları WHO 2010 kriterlerine göre ve Kruger kesin kriterlerine göre değerlendirilmiştir (WHO Laboratory Manual for semen analysis, 2010). Sperm hazırlama yoğunluk gradyen tekniğine ve mikroakışkan yöntemine göre yapılmış, 2 ml semen 2 ml HTF solüsyonu (Irvine Sci, USA) karıştırılarak % 45 ve % 90 gradyen (sil select,) üzerine yayılmış, 2000 rpm de 10 dakika santrifüjlenerek dipte kalan çökelti dışında kalan tabakalar atılmış ve çökelti üzerine iki kez HTF solüsyonu konularak 1500 rpm de iki kez yıkanmıştır. Gradyen yöntemi ile ayrılan spermler üzerine 1 ml HTF (%10 serum ilave edilerek hazırlanmış) eklenmiş ve 30-45 dakika 37°C de CO2 inkübatöründe tutulmuş ve ICSI uygulamasına hazırlanmıştır. Embriyo transferi sonrası 14. gün BHCG testi yapılarak kimyasal gebelik, 12. hafta ise ultrasonda fetal kalp atımı tespiti ile klinik gebelik saptanmıştır. Çalışma sonuçları klinik gebelik pozitifliğine göre değerlendirilmiştir.

3.1. Mikroakışkan Sperm Sıralama Çip

Sperm ayrıştırması için steril bir mikro-pipet kullanarak, giriş portundan mikroakışkan sperm sıralama çipinin (Şekil 4) kanallarına 13 µL ayırma solüsyonu yerleştirilmiş ve daha sonra 2 uL sıvılaştırılmış semen örneği yavaşça giriş portuna eklenmiştir. Mikroakışkan sperm sıralama çipinin medya çıkışına t çıkış portunda toplam 2 µL hafif mineral yağ konulmuştur (19).

3.2. İstatistiksel Analiz

Analizler, Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi, versiyon 24 (SPSS, Chicago, IL) kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama \pm SD veya sayı ve yüzde olarak rapor edilmiştir. Değişkenler normal dağılmış olup olmadıklarını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak araştırılmıştır. Değişkenler normal dağıldığından, karşılaştırma için iki bağımsız örnek t-testi kullanılmıştır. Değişkenler normal olarak dağılmamış ve bu nedenle çalışma ve kontrol gruplarını karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Uygun olduğunda Ki-kare ve Fisher'in kesin testleri, grupların oranlarını karşılaştırmak için kullanılmıştır. Son olarak, kategorik değişkenleri frekans tabloları şeklinde karşılaştırmak için bir Ki-kare testi kullanılmıştır. Bir p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.3. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan malzemeler, firma adı ve alındığı ülkelerin bilgisi ile birlikte Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Malzemeler, Firma Adı ve Alındığı Ülkeler

1	Falcon Grubu Tamamı Pipetler Tüpler	B.D.Bionsciences	ABD
2	Single Step Medium	Life Global	ABD
3	Sss	Life Global	ABD
4	Nunc (150270-4well)	Thermoscientific	Danimarka
5	Hamilton Enjektör	Hamilton Company	ABD
7	Ependorflar	Eppendorfgmbh	Almanya
8	Laminar Flow	K System	Danimarka
	Micro Floudic Chips	Koekbiotech	Türkiye
9	Laminar Flow İçindeki Mikroskop	Olimpus	Almanya
10	Mikromaniplator	Narishigescientificint. Lab.	Japonya
11	ICSI İğnesi	Sunlight	ABD
12	İncubabator Marka Model Vs O2 Kontrollü	K System	Hollanda
13	Santrifuj	Thermo	Danimarka
14	Opu Toplama Seti	Sarsted Gmbh	Almanya
15	Pastör Pipetler	Heinzherenzmedi. Gmbh	Almanya
16	Sperm Wash	Life Global	ABD
17	Pure Sperm	Nidaconinternational	İsveç
18	200 Likpipetör	Eppendorfgmbh	Almanya
19	10 Mikrolitrelikpipetör	Eppendorfgmbh	Almanya
20	Steril Sperm Toplama Kabı	Falcon	ABD
21	Opu Toplarcken Kullanılan Pipet Puarı.	Isolablab. Gmbh	Almanya
22	Mini İnkubator	Labotec	Almanya
23	Makler Kamerası	Sefimedical	İsrail
24	Sperm Sayımında Kullanılan Mikroskop	Olympus	Almanya
25	Hyalurınıdase	Irvine Scentific	ABD
26	Pvp	Irvinescentific	ABD
27	Oil	Irvinescentific	ABD
28	150 mikrolitrelik Denudasyon (Ayıklama Pipeti)	Research Instruments	İngiltere
30	Transfer Kateterleri	CooperSurgical Fertility Companies	ABD
31	Steril Eldiven	Beybi Plastik	Türkiye

4. BULGULAR

Bu çalışmada 287 olguda yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir (Tablo 3).

Toplam 287 ICSI döngüsü analiz edilmiştir. Her iki grubun erkek ve kadın yaşı ve infertilite tipi açısından benzer olduğu görülmüştür (Tablo 3). Perm konsantrasyonunun mikroakışkan ayırma yönteminde daha düşük olduğu halde, sperm motilitesinin daha yüksek olduğu, ayırma işlemi sonrası değerlerin ise mikroakışkan yöntem lehine istatistiki anlamlı yüksek olduğu görülmüştür (p=0,005, tablo 4). İki grup arasında fertilize oosit sayısının mikroakışkan yönteminde daha yüksek olduğu (p=0,001), 2. gün 4 blastomerli embriyo, 3. gün 8 blastomerli embriyo sayısı ve 5. gün blastokist sayısının mikroakışkan yönteminde daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4, p=0,017,p=0,002,p=0,005). Mikroakışkan yönteminin daha iyi embriyo geliştirmesine karşın klinik gebelik oranlarının benzer olduğu anlaşılmıştır (Tablo 5, p=0,342).

Tablo 3: Grupların Özellikleri

	Mikroakışkan Sperm Ayırıcı Çip (n=187)	Dansite-Gradient ayırma (n=100)	P Değeri
Kadın Yaşı	32,35±5,08	33,42±5,43	0,097
Erkek Yaşı	36,38±5,79	36,04±6,57	0,12
İnfertilite Tipi			
Primer	81,7%	80,8%	0,9
Sekonder	18,3%	19,2%	
İnfertilite Süresi	5,03 ± 3,48	6,13 ± 4,1	0,048
Vücut Kitle İndeksi	25,63±12,27	25,01±11,12	0,456
Bazal FSH (IU/L)	6,69±2,4	7,31±1,99	0,34
Bazal E2 (pMol/L)	46,12±12,27	45,69±14,29	0,24
Bazal LH (IU/L)	5,57±3,87	6,2±3,13	0,38

Değerler ortalama ±SD veya % . * p < 0.05, istatistiksel anlamlılık.

Tablo 4. Sperm Oosit Özellikleri ve Embriyo Gelişimi

	Sperm seçimi	n	Ortalama	Std. Sapma	p*
Semen Volüm	Dansite-Gradient ayırma	101	3,10	1,24	0,140
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	2,89	1,04	
Sperm Konsantrasyonu	Dansite-Gradient ayırma	101	53331683,17	31504735,93	0,016
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	43298306,88	34830548,07	
Motilite	Dansite-Gradient ayırma	101	45,12	17,50	0,005
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	63,70	17,80	
Hızlı	Dansite-Gradient ayırma	55	5,80	4,65	0,417
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	187	6,55	6,36	
Toplam Oosit	Dansite-Gradient ayırma	101	12,51	8,51	0,005
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	18,40	13,64	
m2 Oosit	Dansite-Gradient ayırma	99	8,71	6,38	0,001
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	12,21	9,17	
Fertilize Oosit	Dansite-Gradient ayırma	101	6,95	5,36	0,001
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	9,89	8,15	
Blastomer 2.Gün	Dansite-Gradient ayırma	101	3,37	3,59	0,017
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	4,47	3,81	
Arrest 2.Gün	Dansite-Gradient ayırma	101	0,48	1,04	0,360
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	0,59	1,04	
3. Gün 8 Hücre	Dansite-Gradient ayırma	101	2,44	2,78	0,002
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	3,79	3,92	
3. Gün Arrest	Dansite-Gradient ayırma	83	0,22	0,73	0,012
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	0,53	1,01	
5. Gün Blast	Dansite-Gradient ayırma	101	2,25	3,06	0,005
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	189	4,23	4,52	
5. Gün Morula	Dansite-Gradient ayırma	56	1,41	1,47	0,929
	Mikroakışkan sperm ayırıcı çip	146	1,44	2,13	

*: Bağımsız gruplarda t testi.

Tablo 5: Sperm Seçimi Gruplarında Gebelik Durumu

		Sperm Seçimi		Toplam	
		Dansite-Gradient Ayırma	Mikroakışkan Sperm Ayırıcı Çip		
Gebelik	Negatif	Sayı	37	92	129
		%	42,5%	48,7%	46,7%
	Pozitif	Sayı	50	97	147
		%	57,5%	51,3%	53,3%
Toplam	Sayı	87	189	276	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

P= 0,342 (Ki-Kare Analizi)

5.TARTIŞMA

Embriyo kalitesini etkileyen faktörler arasında sperm kalitesi oosit, endometriyal ortam ve endometriyum gibi çok fazla kontrol edilemeyen faktör vardır. Sperm kalitesi ile YÜT başarısı arasında güçlü bir korelasyon vardır (21,22). Aynı ejakülat içinde çok farklı sperm olduğu ve normal morfoloji % 4 ve üzerinde bulunduğu düşünüldüğünde sperm seçim yöntemlerinin önemi daha iyi anlaşılacaktır. Böylece başarı, uygun yöntemler kullanılarak ejakülattaki spermelerden başarılı bir sperm seçimine dayanmaktadır. Döllenme için başarılı sperm, iyi morfolojiye, doğru yapıya, motiliteye ve normal genomik içeriğe sahip olmalıdır. Geliştirilen yeni sperm seçim teknolojileri, YÜT başarısını arttırmak için başarılı spermelere daha çok odaklanmaktadır. Bu tür sperm seçiminin ana amacı, DNA fragmentasyonu olmayan bir çekirdeği içeren oldukça hareketli, morfolojik olarak normal bir sperm sağlamaktır.

Ayrıca vajinanın asidik doğası, servikal mukus, uterotubal bağlantısının darlığı veya spermın oosite giden yolculuğu sırasında bağışıklık sisteminin cevabı gibi dişi üreme sistemi için birçok doğal fizyolojik tarama yöntemi vardır. Bu doğal sperm

seçimi, seçilmiş birkaç en hareketli ve fonksiyonel olarak normal spermin dölleme için oosite ulaşmasına izin vermektedir. Mikroakışkan sistemi, spermin dışı üreme sistemindeki oosit doğal hareketini taklit eder ve kanal sistemi boyunca başarılı spermi izole etmektedir (23-25).

Sperm seçimi için ideal teknik hızlı, yoğun emek içermeyen, ucuz, normal morfoloji ve nükleer olgunluğa sahip en hareketli spermi izole etmeli ve santrifüj adımlarını ortadan kaldırarak ROS üretimini ve DNA fragmentasyonunu azaltmalıdır. İntrauterin inseminasyon (IUI) için semen hazırlama tekniklerinin başarısını değerlendiren yeni bir meta-analiz, IUI için spesifik bir hazırlama tekniğini önerecek yeterli kanıt olmadığını göstermiştir (26). Böylece, YÜT için sperm seçim teknikleri sadece teorik düşüncelere dayanabilmektedir. Sperm seçimine yönelik mevcut standart prosedürler arasında, yüzdürme ve yoğunluk içeren sıralamalı santrifüjleme yer alır ve en yaygın olarak sperm sınıflandırması için kullanılmaktadır (27). Bununla birlikte, teknikler bazı sınırlamalara sahiptir: bunlar zaman alıcı, emek yoğun ve teknisyenlere bağımlıdır. Ayrıca sperm kalitesini daha yüksek ROS oluşumu ve DNA fragmentasyonu ile azaltabilmektedir (11,27). Diğer seçim yöntemlerinden Dansite Gradient Santrifüjleme (DGS) ile birlikte kullanılan MACS ve DGS'nin karşılaştırıldığı çalışmalarda; özellikle anormal sperm parametrelerine sahip olan ve aynı zamanda apoptotik marker seviyeleri ve DNA fragmentasyon oranı yüksek saptanmış infertil hastalarda, DGS-MACS uygun bir yöntem olarak gözükmektedir. Bu çalışmalarda fertilizasyon oranları bakımından bir farklılık gözlenmezken, DGS ile birlikte kullanılan MACS grubunda, embriyo bölünme ve klinik gebelik oranları daha yüksek bulunmuştur (28). Son yıllarda da MACS yönteminin kullanımı ile ICSI sonrası sağlıklı bebeklerin doğduğu rapor edilmiştir (29,30). Bu nedenle yüksek bir apoptoz insidansı ve DNA fragmentasyon oranının olduğu vakalarda ART protokollerinin içine MACS'ın yerleştirilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Bütün bunlara rağmen MACS yönteminin çok da pratik olmadığı gözönünde tutulmalıdır.

Bir mikroakışkan sperm sıralama çip basit, maliyet-etkin, kimyasal-içermez, mekanik pertürbasyon içermez ve santrifüjleme adımını ortadan kaldırmaktadır. Doğru yapıya, yüksek DNA bütünlüğüne ve daha az ROS'a sahip en hareketli ve fonksiyonel sperm, daha az hareketli veya immotil spermi geride bırakarak optimize edilmiş bir zaman noktasında mikroakışkan sperm sıralama çipinin mikro kanallarından selektif olarak geçebilmektedir (31,32).

İrez ve arkadaşları 2014 de yaptıkları bir çalışmada PVP ye dayalı sperm seçiminin klinik gebelik oranlarını anlamlı bir şekilde artırdığını göstermişlerdir (33). Bu çalışmada bazı spermlerin PVP gradyene dayalı bir direnç gösterdiği ve dirençli olanların seçiminde başarılı gebelikler elde edildiği gösterilmiştir (33). Bu çalışma ise mikroakışkan sperm sıralama çipinin sonuçlarını ICSI sonucu üzerine ilk değerlendiren ve bu sonuçları gradyan yoğunluklu santrifüjleme ile karşılaştıran bir çalışmadır. Mevcut çalışma sonuçları, seçilmemiş infertil popülasyonda kullanıldığında mikroakışkan sperm sıralama çip grubunda klinik gebeliklerin anlamlı olarak daha yüksek olmadığını göstermektedir, ancak gradyen yöntemine kıyasla embriyo gelişiminin daha iyi olduğu anlaşılmaktadır. Sperm konsantrasyonlarının 10 milyon / ml'den yüksek olduğu hastalarda fertilizasyon ve gebelik oranlarındaki düzelmelerin daha belirgin olduğu saptanmıştır. Sperm konsantrasyonları 10 milyon / ml'nin altında olan diğer gruplarda gebelik oranlarının artmasına yönelik bir eğilim olmasına rağmen, diğer sperm sayısı gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklar elde edilememiştir. Mikroakışkan cihazlar, "labs-on-a-chip", bir seminal plazma, olgun ve olgunlaşmamış spermatozoa, üreme olmayan hücrelerin bir karışımından nispeten küçük sperm örnekleri ile ileri hareketli sperm sıralama için tek kullanımlık, kullanımı kolay ve ucuz bir yöntemdir. Seçilmemiş infertil bir popülasyonda sperm seçiminde mikroakışkan sperm sıralama çipinin kullanılması ile embriyo gelişiminin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın seçilmiş hasta gruplarında tekrarlanması gerektiği düşünülmektedir.

6.SONUÇ

Sonuç olarak mikrochip yönteminin daha iyi kaliteli embriyo geliştirmede başarısı bu çalışmada gösterilmiştir. Özetlenecek olursa geliştirilen bu yöntemde amaç; IVF ya da ICSI sırasında matur, apoptotik olmayan, DNA fragmantasyonu bulunmayan, morfolojik olarak normal spermi seçmektir. Yöntemin IVF ya da ICSI'de kullanımı sonucu elde edilen ilk sonuçlar fertiilizasyon ve embriyo gelişimi açısından olumlu yönde etkileyebilecek potansiyelde oldukları şeklindedir. Bu umut verici sonuçlara rağmen yeterli hasta sayısında çalışılması, randomize kontrollü çalışmalar ile sonuçların doğrulanması gerekmektedir. Bu alanda yapılan çalışmaların çoğu, gebelik ve canlı doğum oranındaki farklılıkları sonuçlandırmak için yeterince güçlüdür, fakat bazıları yetersiz bulunmuştur. Gelişmiş sperm seçim yöntemleri için güvenlik ve etkinlik önlemlerinin alındığı; özellikle doğan çocukların uzun süre takipleri yapılarak, etkinliği tespit edilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Wright VC., Chang J., Jeng G., Macaluso M. Assisted Reproductive Technology Surveillance. United States, 2005. MMWR Surveill Summ 2008, 57:1–23.
2. Ainsworth C., Nixon B., Aitken RJ. Development Of Novel Electroforetic System For The Isolation Of Human Spermatozoa. Hum. Reprod. 2005, Aug 20(8):2261-70.
3. Barroso G., Valdespin C., Vega E., Kershenovich R., Avila R., Avendano C., Oehninger S. Developmental Sperm Contributions: Fertilization And Beyond. Fertil Steril. 2009, Sep;92(3):835-48.
4. Akerlof E, Fredricson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A. Comparison Between A Swim-Up And A Percoll Gradient Technique For The Separation Of Human Spermatozoa. Int J Androl 1987;10: 663–669.
5. Le Lannou D., Blanchard Y. Nuclear Maturity And Morphology Of Human Spermatozoa Selected By Percoll Density Gradient Centrifugation Or Swim-Up Procedure. J Reprod Fertil. 1988, Nov;84(2):551-6.
6. Francavilla S., Bianco MA., Cordeschi G., D’Abrizio P., De Stefano C., Properzi G., Francavilla F. Ultrastructural Analysis Of Chromatin Defects In Testicular Spermatids In Azoospermic Men Submitted To TESE-ICSI. Hum Reprod. 2001,Jul;16(7):1440-8.
7. Perrard MH., Prisant N., Geoffroy-Siraudin C., Segretain D., Pointis G., Guichaoua MR., Durand P. Analysis Of The Intratesticular Control Of Spermatogenesis By Ex-Vivo Approaching. Histochem Cytobiol. 2009;47(5):S89-94.
8. Rengan AK., Agarwal A., Van Der Linde M., Du Plessis SS. An Investigation Of Excess Residual Cytoplasm In Human Spermatozoa And Its Distinction From The Cytoplasmic Droplet. Reprod Biol Endocrinol. 2012, Nov 17;10: 92.
9. Alvarez Sedo C., Rawe VY., Chemes HE. Acrosomal Biogenesis In Human Globozoospermia: Immunocytochemical, Ultrastructural And Proteomic Studies. Hum Reprod. 2012 Jul;27(7):1912-21.

- 10.** Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. Sperm Selection In Natural Conception: What Can We Learn From Mother Nature To Improve Assisted Reproduction Outcomes? *Hum Reprod Update*. 2015 Nov-Dec;21(6):711-26.
- 11.** Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence Of Semen Processing Technique On Human Sperm DNA Integrity. *Urology* 2000;56:1081–4.
- 12.** Donnelly ET, O’Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences In Nuclear DNA Fragmentation And Mitochondrial Integrity Of Semen And Prepared Human Spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15: 1552–61.
- 13.** Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study Ofmitochondrial Membrane Potential, Reactive Oxygen Species, DNA Fragmentation And Cell Viability By Flow Cytometry In Human Sperm. *Hum Reprod* 2002;17:1257–65.
- 14.** Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Et Al. The Use Of Two Density Gradient Centrifugation Techniques And The Swim-Up Method To Separate Spermatozoa With Chromatin And Nuclear DNA Anomalies. *Hum Reprod* 2000;15:1112–26.
- 15.** WHO Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus And Interaction. 5th Ed. Cambridge: World Health Organisation; 2010.
- 16.** Wang J, Fan HC, Behr B, Quake SR. Genome-Wide Single-Cell Analysis Of Recombination Activity And De Novo Mutation Rates In Human Sperm. *Cell* 2012;150:402–412.
- 17.** Chung Y, Zhu X, Gu W, Smith GD, Takayama S. Microscale Integrated Sperm Sorter. *Methods Mol Biol*. 2006;321:227-44.
- 18.** Malvezzi H, et all, Sperm Quality After Density Gradient Centrifugation With Three Commercially Available Media: A Controlled Trial, Malvezzi et al. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014, 12:121;4.
- 19.** Hong-Yuan Huang, Hui-Ting Fu, Hsin-Yao Tsing, Hung-Ju Huang, Chin-Jung Li And Da-Jengyao Motile Human Sperm Sorting By An Integrated Microfluidic System

Journal Of Nanomedicine&Nanotechnology,2014, 5:199. Doi:10.4172/2157-7439.1000199.

20. ASRM Alpha Eshre,The Istanbul Consensus Workshop On Embryo Assessment: Proceedings Of An Expert Meeting Alpha Scientists In Reproductive Medicine And ESHRE Special Interest Group Of Embryology.Human Reproduction, Volume 26, Issue 6, 1 June 2011, Pages 1270–1283, <https://doi.org/10.1093/humrep/der037>.

21. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S, Predictive Value Of Abnormal Sperm Morphology In In Vitro Fertilization, Fertility And Sterility [1988, 49(1):112-117].

22. Berker, B., Şükür, Y.E., Kahraman, K., Atabekoğlu, C.S., Sönmezer, M., Özmen, B., And Ateş, C. Absence Of Rapid And Linear Progressive Motile Spermatozoa 'Grade A' In Semen Specimens: Does It Change Intrauterine Insemination Outcomes?. Urology. 2012; 80: 1262–1266.

23. Xie L, Ma R, Han C, Su K, Zhang Q, Qiu T, Wang L, Huang G, Qiao J, Wang J, Cheng J. Integration Of Sperm Motility And Chemotaxis Screening With A Microchannel-Based Device. Clin Chem. 2010;56(8):1270-8.

24. Tasoglu S, Safaee H, Zhang X, Kingsley JL, Catalano PN, Gurkan UA, Nureddin A, Kayaalp E, Anchan RM, Maas RL, Tüzel E, Demirci U. Exhaustion Of Racing Sperm In Nature-Mimicking Microfluidic Channels During Sorting. Small. 2013 25;9(20):3374-84.

25. Knowlton SM, Sadasivam M, Tasoglu S. Microfluidics For Sperm Research. Trends Biotechnol. 2015;33(4):221-9.

26. Boomsma CM¹, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen Preparation Techniques For Intrauterine Insemination. Cochrane Database Syst Rev. 2007 Oct 17;(4):CD004507.

27. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance Of Reactive Oxygen Species And Antioxidants In Defining The Efficacy Of Sperm Preparation Techniques. J Androl. 1988;9(6):367-76.

- 28.** Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A. Clinical Outcome Of Magnetic Activated Cell Sorting Of Non-Apoptotic Spermatozoa Before Density Gradient Centrifugation For Assisted Reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:375–381.
- 29.** Polak de Fried E, Denaday F. Single And Twin Ongoing Pregnancies In Two Cases Of Previous ART Failure After ICSI Performed With Sperm Sorted Using Annexin V Microbeads. *Fertil Steril* 2010;94:351 E315–358.
- 30.** Romany L, Meseguer M, Gracia-Herrero S, Pellicer A, Garrido N. Magnetic Activated Sorting Selection (Macs) Of Non Apoptotic Sperm (Nas) Improves Pregnancy Rates In Homologous Intrauterine Insemination (Iui). Preliminary Data. *Fertil Steril* 2010;94:S14
- 31.** Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, Mutter GL, Tüzel E, Demirci U. Selection Of Functional Human Sperm With Higher DNA Integrity And Fewer Reactive Oxygen Species. *Adv Healthc Mater.* 2014;3.
- 32.** Knowlton SM, Sadasivam M, Tasoglu S. Microfluidics For Sperm Research. *Trends Biotechnol.* 2015;33(4):221-9.
- 33.** Irez T, Ocal P, Guralp O, Kaleli S, Ocer F, Sahmay S, Sperm Selection Based On Motility In Polyvinylpyrrolidone (Pvp) Is Associated With Successful Pregnancy And Embryo Development: *Andrologia* 2013,45(4),240-7, 2012, xx, 1–8 doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01337.x Blackwell Verlag GmbH.

8.ETİK KURUL KARARI



SAYI: ATADEK-2018/8
KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr.Ersi Kalfoglu, Prof.Dr.Bülent Tıraş, Bio. Özcan Düzcü

Sorumluluğunu yürüttüğünüz “**Yeni Sperm Seçme Tekniği Olan Mikroçip Yönteminin Embriyo Kalitesi Üzerine Etkisi**” başlıklı proje 31.05.2018 tarih 2018/8 Sayılı Atadek Toplantısında görüşülmüş olup 2018-8/1 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.



Prof.Dr. İsmail Hakkı Ulus
ATADEK Başkanı

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU (ATADEK)

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın başlığı:

Yeni Sperm Seçme Tekniği Olan Mikroçip Yönteminin Embriyo Kalitesi Üzerine Etkisi

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın yürütücüsü (sorumlusu):

Prof. Dr.Ersi Kalfoglu, Prof.Dr.Bülent Tıraş, Bio. Özcan Düzcü

Karar:

Kabul (Etik olarak uygun) (x) **Revizyon ()*** **Etik olarak uygun değil ()****

Toplantı Tarihi:31.05.2018

Karar Numarası: 2018-8/1

Kurul Üyesi-Unvan Ad-Soyad	İmza	Karara	
		Katılıyorum	Katılmıyorum***
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus (Başkan)		(x)	()
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan Yrd)		(x)	()
Prof.Dr. Mert Ülgen		()	()
Prof.Dr. Ükke Karabacak		()	()
Prof.Dr. A.Elif Eroğlu Büyükköner		()	()
Doç.Dr. Berrin Karadağ		()	()
Doç.Dr. Günseli Bozdoğan		(x)	()
Dr. Öğr.Üyesi Fatih Artvinli		(x)	()

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Özcan	Soyadı	Düzcü
Doğ. Yeri	Üsküdar	Doğ. Tarihi	28.12.1983

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	İstanbul Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Kasımoğlu Fen Lisesi	2001

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Yılı
Biyolog	Maslak Acıbadem Hast. IVF Lab.	2016-Halen Çalışmakta
Biyolog	İstanbul Tüp Bebek Merkezi	2007-2016
Biyolog	Bahçeci Sağlık Grubu	2013-2014

Yabancı dilleri	Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi