

T.C
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**IN VITRO FERTİLİZASYON UYGULAMALARINDA MİKROAKIŞKAN
YÖNTEMLE SPERM HAZIRLIĞININ İNSAN EMBRİYO GELİŞİMİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MOLEKÜLER BİYOLOG BERKAY AKÇAY

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Emir TAN

(İSTANBUL-2018)

TEZ ONAYI

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
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: .../.../2018

Prof. Dr. Emir TAN
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Engin ORAL
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç.Dr.Meriç KARACAN
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanı

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 çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.

Berkay AKÇAY

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım eski Klinik Embriyoloji Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Tülay İrez'e**

Destekleri ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam **Prof. Dr. Mustafa Bahçeci'ye** ve **Bahçeci Sağlık Grubu** çalışanlarına,

Tezimin başlangıcından itibaren bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan Laboratuvar Direktörüm **Dr.Necati Fındıklı** ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim görevlilerinden **Prof.Dr.Engin Oral'a**,

Çalışma disiplini ile örnek aldığım tez danışmanım **Prof.Dr.Emir TAN'a**

Türlü cefalar ile beni bu tezi yazabilecek günlere getiren **Annem** ve rahmetli **Babama**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-------------|
| İÇİNDEKİLER | v |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | vi |
| TABLolar LİSTESİ | vii |
| SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ | viii |
| ÖZET | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 4 |
| 2.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri | 4 |
| 2.2. Çalışmada kullanılan cihaz, solüsyon ve tek kullanımlık malzemeler | 5 |
| 2.2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar | 5 |
| 2.2.2. Çalışmada kullanılan solüsyonlar | 5 |
| 2.2.3. Çalışmada kullanılan tek kullanımlık malzemeler | 6 |
| 2.3. Hazırlık İşlemleri | 7 |
| 2.3.1. OPU kültür kabı hazırlığı | 7 |
| 2.3.2. Hyaluronidaz (ayıklama) sonrası için kültür kabı hazırlığı | 7 |
| 2.3.3. Hepseli medium hazırlığı | 8 |
| 2.3.4. IMSI Kültür kabı hazırlığı | 8 |
| 2.3.4. Embriyo Kültür kabı hazırlığı | 8 |
| 2.4. Protokoller | 9 |
| 2.4.1. Ovülasyon indüksiyonu protokolleri ve yumurta toplama işlemi (OPU) | 9 |
| 2.4.2. Sperm örneğinin hazırlanması | 10 |
| 2.4.3. İnseminasyon öncesi hyaluronidaz (ayıklama) enzimi uygulaması | 12 |
| 2.4.4. IMSI uygulaması | 13 |
| 2.4.5. Fertilizasyon ve ileri embriyo kültürü | 14 |
| 3. BULGULAR | 16 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ | 18 |
| 5. KAYNAKÇA | 21 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Mikroakışkan-tabanlı sperm seçimi için kullanılan Fertile ® ürünü | 2 |
| Şekil 2: Yumurta toplama işlemi için hazırlanan kültür kabı | 7 |
| Şekil 3. Hyaluronidaz uygulaması için hazırlanan 4 damlacıklı kültür kabı..... | 7 |
| Şekil 4: ICSI için kullanılan kültür kabı..... | 8 |
| Şekil 5: Embriyo kültürü için kullanılan kültür kabı..... | 9 |
| Şekil 6: OPU işleminde kullanılan cihazlar | 10 |
| Şekil 7: Hyaluronidaz uygulaması için kullanılan kültür kabı..... | 13 |

TABLÖLAR LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1 Hastaya ve siklusa ait demografik özellikler | 4 |
| Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar | 5 |
| Tablo 3: Çalışmada kullanılan solüsyonlar | 5 |
| Tablo 4:Çalışmada kullanılan tek kullanımlık malzemeler | 6 |
| Tablo 5: Sperm hazırlığı amaçlı gradient solüsyonlarının hazırlanışı | 11 |
| Tablo 6: Gruplara ait laboratuvar gelişim parametreleri | 16 |
| Tablo 7: Sperm hazırlama yöntemine göre klinik ve canlı doğum sonuçları | 17 |

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|-----------------|---|
| mL | mililitre |
| μ l | mikrolitre |
| cm ² | santimetrekare |
| ⁰ C | santigrat derece |
| Rpm | Dakikada devir sayısı |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| O ₂ | Oksijen |
| YÜT | Yardımla üreme teknikleri |
| OPU | Oosit toplama işlemi |
| ICSI | İntrasitoplasmik sperm enjeksiyonu |
| IMSI | İntrasitoplazmik Morfolojik olarak Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu |
| LAF | Laminar air flow |
| MASS | Mikroakışkan-tabanlı Sperm Seçimi |
| DG | Dansite Gradient |
| mII | Metafaz II aşaması |
| DÇET | Dondurulmuş çözülmüş embriyo transferi |

ÖZET

Bu çalışmanın amacı mikroakışkan-tabanlı sperm seçme (MASS) yöntemi ile gerçekleştirilen sperm hazırlığı ile konvansiyonel Dansite Gradient (DG) yöntemi ile gerçekleştirilen sperm hazırlığının laboratuvar ve klinik verimliliği bakımından değerlendirmektir. Çalışma infertilite tedavisi gören izole teratospermi vakalarında elde edilmiş kardeş oositlerin eşleşmiş iki grup halinde prospektif değerlendirmesi şeklinde gerçekleştirildi. Matür (mII) oositler randomize olarak iki gruba ayrıldı ve birinci grup MASS yöntemi ile ve ikinci grup DG yöntemi ile elde edilmiş spermler kullanılarak İntrasitoplazmik Morfolojik olarak Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu (IMSI) tekniği kullanılarak insemine edildi. Elde edilen embriyolar laboratuvar ortamında blastosist aşamasına kadar takip edildiler ve uygun gelişim gözlenen tüm embriyolar (3. Günde veya blastosist aşamasında) donduruldu. Tüm embriyo transferleri dondurulmuş/çözülmüş embriyo transferi (DÇET) olarak gerçekleştirildi. Fertilizasyon oranı, erken dönem klivaj oranı, 3. günde grade I embriyo oranı, blastosist gelişim oranı, klinik gebelik oranı ve canlı doğum oranı çalışmanın temel çıktı parametreleri olarak belirlendi. Toplamda 30 hastanın 30 siklusundan 540 kümülüs oosit kompleksi (KOK) ve 439 mII oosit elde edildi. MASS (n=217) ve DG (n=222) yöntemi ile insemine edilen oositler arasında yapılan karşılaştırmada temel laboratuvar parametreleri olan fertilizasyon oranı (73,7% vs. 77,4%), erken dönem klivaj oranı (98,8% vs. 99,4%), 3. günde grade I embriyo oranı (71,5% vs. 74,7%) ve blastosist gelişim oranı (45,8% vs. 48,4%) bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.5$). Gerçekleştirilen 26 DÇET siklusu sonrası 18 pozitif b-hCG (69,2%; ET başına) ve 17 Sac+ gebelik (65,4% ET başına) elde edildi. Onbiri tekiz ve 3'ü ikiz olmak üzere toplamda 17 sağlıklı bebek doğdu. Bebeklerin 4'ü MASS yöntemi ile seçilmiş spermlerin kullanılması ile elde edildi. Çalışmamızdaki öncül sonuçlar, izole teratozoospermia vakalarında DG yöntemine kıyasla Fertile ®

ürününün kullanımı doğrultusunda MASS yöntemi ile gerçekleştirilen sperm seçiminin kabul edilebilir laboratuvar ve klinik çıktılar oluşturduğunu işaret etmektedir. MASS yöntemi ile sperm seçiminin konvansiyonel ART uygulamalarındaki faydalarını valide etmek için daha fazla yeni çalışmaya ihtiyaç vardır.



ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the laboratory and clinical efficiency of sperm preparation through a microfluidics-based sperm sorter (MFSS) over conventional density gradient (DG) sperm preparation approach. This is a paired prospective trial with sibling oocytes of isolated teratozoospermia cases undergoing infertility treatment. Mature (m2) oocytes were randomly allocated and inseminated by intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) with spermatozoa prepared either through MFSS or DG method. Resulting embryos were cultured up to blastocysts stage before (or after if cryopreserved on day 3) a cryopreservation/warming cycle. All embryo transfers were performed as frozen embryo transfer (FET). Main outcome measures were fertilization rate, cleavage rate, percent of grade I embryos on day 3 of embryo development, blastocyst development rate, clinical pregnancy and live birth rates. A total of 540 cumulus oocyte complexes (COCs) and 439 m2 oocytes were retrieved from 30 patients/cycles. In each case, m2 sibling oocytes were randomly (and equally where available) allocated either in MFSS group or DG group for IMSI. After IMSI, resulting embryos were individually cultured until blastocyst stage. No statistically significant differences were found with respect to main laboratory performance indicators including fertilization rates (73,7% vs. 77,4%), early cleavage rate (98,8% vs. 99,4%), grade I embryos on day 3 (71,5% vs. 74,7%) as well as blastocyst development rate (45,8% vs. 48,4%) between groups respectively ($p>0.5$). In 26 cycles, FET resulted in 18 positive b-hCG (69,2% per ET) and 17 Sac+ pregnancies (65,4% per ET). A total of seventeen healthy babies have been born as 11 singletons and 3 twins. Four of these babies developed from embryos inseminated by spermatozoa selected through the MFSS device. Our preliminary results indicate that, when compared to conventional DG sperm preparation method, use of MFSS device for sperm preparation results in acceptable laboratory as well as

clinical outcome in isolated teratozoospermia cases. Further studies are needed to validate the benefits of MFSS-based sperm selection approach in contemporary ART practice.



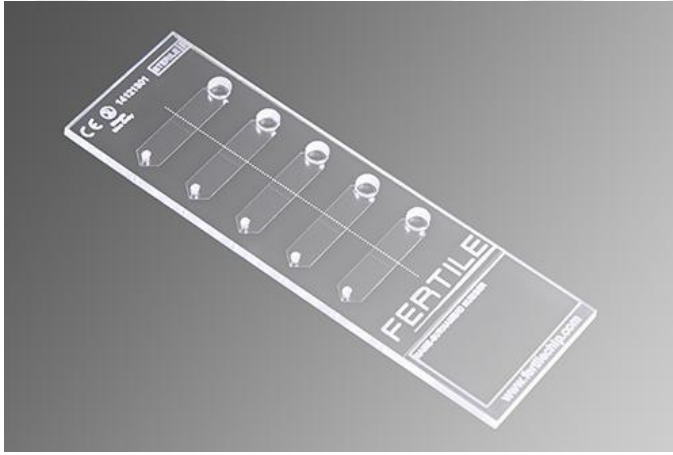
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğal veya yardımcı üreme teknikleri (YÜT) sonrası elde edilen gebeliklerde gebelik başarısı özellikle embriyoyu oluşturan gamet hücrelerinin fizyolojik, fonksiyonel ve genetik yönden sağlıklı olup olmadıkları ile doğrudan ilişkilidir. Çalışmalar, dünya genelinde yaklaşık 50-80 milyon çiftin kısırlık sorunu ile karşı karşıya olduğunu bildirmektedir [1]. Doğal yollar ile çocuk sahibi olamayan ve YÜT tedavisi adayı çiftlerde bu yöndeki problemlerin yaklaşık %50'si sperm hücrelerinin kantitatif ve/veya kalitatif özellikleri yönünden problem gözlenen erkek bireylerden, yani erkek faktöründen kaynaklanmaktadır [2]. Tedavi başarısının mümkün olan en üst seviyede sağlanabilmesi için sperm hücrelerinin mümkün olduğu kadar doğal yapıları ve özellikleri korunarak hazırlanması büyük önem taşımaktadır. Günümüzde İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yönteminin YÜT tedavilerinde kullanımının dünya genelinde yaygınlaşması ile çok düşük sperm sayıları ve hareketliliği gözlenen olgularda bile başarılı gebelikler ve canlı doğumlar elde edilmektedir [3].

Her geçen gün yeni yöntemler geliştirilmekte olsa da, günümüzde YÜT tedavilerinde kullanılan sperm hücreleri, halen işlem günü erkek bireyden alınan semen örneğinin yüzdürülmesi (swim up, SU) ardışık sentrifügasyon aşamaları ile çöktürülmesi (dansite gradient, DG) ve yıkanması ile seminal plazmadan ayrılması veya bu iki yöntemin kombine edilmesi sayesinde en hareketli sperm hücrelerinin seçilmesi esasına dayanır [4, 5]. Bununla birlikte, ardışık sentrifügasyon aşamalarının da hücrelerin taşıdığı ve embriyoya sağlıklı olarak aktarılması gereken genetik materyal üzerinde DNA hasarı oluşturabildiği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir [6, 7]. Bu olası hasarların en aza indirilmesi ve tedavi sürecinde mümkün olduğu kadar doğala yakın bir sperm hazırlığı sağlanması amacı ile yakın bir süre önce mikroakışkan (microfluidics) teknolojisi kullanılarak sperm hazırlığının sağlanabileceği bazı cihaz ve aparatlar geliştirilmiştir [8, 9]. Halen geliştirilmesi ve iyileştirilmesi devam eden bu ürünlerin klinik kullanım potansiyelleri ve performansları konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Fertile ® marka MFSS aparatı, androloji laboratuvarlarında teknisyen ve uzmanların rahatlıkla ve sofistike ek teçhizat kullanımına gerek duymadan, santrifüj, pipet ile karıştırma gibi sağlıklı hücrelere fiziki olarak ta zarar verebilecek teknikleri kullanmadan, morfolojik, genetik ve fizyolojik olarak daha iyi durumda olan

spermilerin diğerk ölü, olgunlaşmamış ve düşük kaliteli sperm hücrelerinden ayrılmasını sağlamak amacı ile tasarlanmış mikroakışkan-tabanlı bir sperm hazırlama ve seçme aparatıdır [10]. Üründe numunenin uygulandığı giriş ve işlem görmüş ürünün alındığı çıkış hazneleri bulunmaktadır. Tek kullanımlık steril olarak üretilen ve kullanıcıya sunulan ürün, pasif kuvvetler kullanan mikroakışkan teknolojisi ile spermilerin hareketi için dişi üreme sisteminde bulunan doğal ortamın bir benzerini oluşturarak en iyi sonucu vermesi için tasarlanmıştır. Biyolojik olarak tamamen uyumlu malzemelerden imal edilmektedir ve ergonomisi ve çalışma güvenliği düşünülmüş olup kullanıcıya en rahat işlem yapabileceği halde sunulmuştur.



Şekil 1. Mikroakışkan-tabanlı sperm seçimi için kullanılan Fertile® ürünü

Fertile® ürününün firma tarafından sperm kalitesinin hareketliliğinin düşük olduğu hastalarda kullanılması tavsiye edilmektedir. Ayrıca firma tarafından sperm hazırlığında sentrifügasyon ve vorteks gibi fiziksel olarak canlı hücreye zarar verebilecek olan basamaklar kullanılmadığından sperm hazırlığının kısa sürede, daha az laboratuvar işlemleri/aşamaları gerektirecek şekilde yapılabildiği ifade edilmektedir. Böylece DNA kalitesi ve fizyolojik olarak en iyi durumdaki spermilerin seçilmesi sağlandığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda, yerli bir firma tarafından üretilen ve klinik kullanıma sunulan mikroakışkan-tabanlı ürünün, sperm hazırlığı ve seçimi aşamasındaki performansı, iyi prognoz beklenen izoleteratozoospermi tanısı konmuş çiftlerin kardeş

yumurtaları/embriyoları üzerinde klasik (DG metodu) sperm hazırlama yöntemi ile eş zamanlı olarak karşılaştırılması amaçlandı. İşlem sırasında ve sonrasında elde edilen embriyo gelişim performansları iki ayrı sperm hazırlama metodu olarak analiz edildi, gruplar arası fertilizasyon, erken klivaj dönemi ve blastosist dönemi embriyo gelişim parametreleri bakımından karşılaştırılarak yöntemlerin etkinlikleri değerlendirildi.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

Bu çalışma Şubat 2017-Ağustos 2017 tarihleri arasında Bahçeci Fulya Tüp Bebek merkezinde tedavi gören ve çalışma kriterlerine uygun bulunan 30 vakanın kardeş oositleri üzerinde prospektif olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya, her iki partnerin de karyotip analizlerinin normal olduğu, kadın yaşının 20-38 aralığında olduğu, OPU sırasında en az 10 KOK elde edilmiş, stimülasyona iyi yanıt alınan, erkekte izole teratozoospermia dışında belirgin bir sperm probleminin gözlenmediği vakalar dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen vakaların ve siklusların genel demografik özellikleri Tablo 1.'de görülmektedir. Bu özelliklerin yanında olguların 8'inde en az 1 erken gebelik kaybı öyküsü tespit edildi ve 7 vakada gelişen embriyolarda kapsamlı kromozom taraması amaçlı olarak PGT-A (İmplamantasyon öncesi genetik tanı) uygulandı. Çalışma İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (No.29122016/006).

Tablo 1. Hastaya ve siklusa ait demografik özellikler

| | n, Ortalama \pm SS |
|--------------------------------------|----------------------|
| Hasta/siklus sayısı | 30 |
| Kadın yaşı (yıl) | 30,8 \pm 4,6 |
| Erkek yaşı (yıl) | 34,8 \pm 4,3 |
| Önceki deneme sayısı | 1,5 \pm 2,3 |
| hCG günü E2 değeri (pg/ml) | 2851,9 \pm 2581,5 |
| hCG günü P4 değeri (ng/ml) | 1,0 \pm 0,6 |
| Toplam FSH dozu (IU) | 1929,3 \pm 894,4 |
| Alınan KOK sayısı | 17,8 \pm 5,2 |
| M2 oosit sayısı | 14,5 \pm 4,7 |
| Fertilize oosit sayısı (2pn) | 10,9 \pm 4,6 |
| DG öncesi sperm kons. (milyon/ml) | 55,2 \pm 21,3 |
| DG öncesi sperm motilitesi (Total) | 45,5 \pm 5,8 |
| DG sonrası sperm kons. (milyon/ml) | 46,1 \pm 19,4 |
| DG sonrası sperm motilitesi (Toplam) | 86,8 \pm 5,0 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Transfer edilen embriyo sayısı | 1,3 ± 0,5 |
|--------------------------------|-----------|

2.2. Çalışmada kullanılan cihaz, solüsyon ve tek kullanımlık malzemeler

2.2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlara ait marka ve model bilgileri Tablo 2’de gösterilmiştir:

Tablo 2: Çalışmada kullanılan cihazlar

| Cihaz adı | Marka | Model |
|---------------------------|---------|--------------|
| Aspiratör ve ısıtıcı blok | SCANLAF | Fortuna 1200 |
| LAF | SCANLAF | Fortuna 1200 |
| Stereomikroskop | ZEISS | Stemi 508 |
| Invert mikroskop | ZEISS | Observer21 |
| Mikromanipulâtör | ZEISS | Observer 21 |
| İnkübatör | ESCO | Miri |
| Kriyotank | MVE | XC47/11-6 |

2.2.2. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

Çalışmada kullanılan solüsyonlara ait katalog ve üretici firma bilgileri Tablo 3’te gösterilmiştir:

Tablo 3: Çalışmada kullanılan solüsyonlar

| Solüsyon adı | Katalog no | Üretici firma |
|------------------------------------|---------------|--------------------|
| Modifiye HTF (mHTF) mediumu | 90126 | Irvine Scientific |
| Sperm yıkama mediumu | 9983 | Irvine Scientific |
| Puresperm-100 | ET-HIS05QI/04 | Nidacon |
| CSCM™ Mediumu (Komplet) | 90165 | Irvine Scientific |
| Serum substitute supplement (SSS™) | 99193 | Irvine Scientific |
| Hyaluronidase solution | 90101 | Irvine Scientific |
| PVP % 10'luk | 90123 | Irvine Scientific |
| Embriyo kültür yağı | 9305 | Irvine Scientific |
| Sorting mediumu | - | KOEK Biotechnology |

2.2.3. Çalışmada kullanılan tek kullanımlık malzemeler

Çalışmada kullanılan tek kullanımlık atılabilir malzemelere ait katalog ve üretici firma bilgileri Tablo 4’te gösterilmiştir:

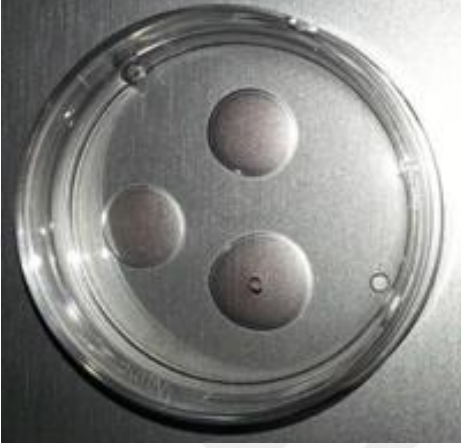
Tablo 4:Çalışmada kullanılan tek kullanımlık malzemeler

| Malzeme adı | Marka | Katalog no | Üretici firma |
|-------------------------------|--------------|-------------------|----------------------|
| Oosit toplama seti | Smiths | ONS1833 | Smiths Medical |
| Konik tüp(15 ml) | Falcon | 352095 | BD Sciences |
| 5 ml'lik tüp | Falcon | 352003 | BD Sciences |
| 25 cm ² 'lik flask | Falcon | 353009 | BD Sciences |
| 60 cm kültür kabı | Falcon | 353652 | BD Sciences |
| 60 cm kültür kabı | NUNC | 150270 | Thermo Scientific |
| MASS ürünü | Fertile | | KOEK Biotechnology |
| Holding pipeti | Humagen | MPH-SM-30 | Origio |
| Mikroenjeksiyon pipeti | Sunlight | SIC-50H-30 | Sunlight Medical |

2.3. Hazırlık İşlemleri

2.3.1. OPU kültür kabı hazırlığı

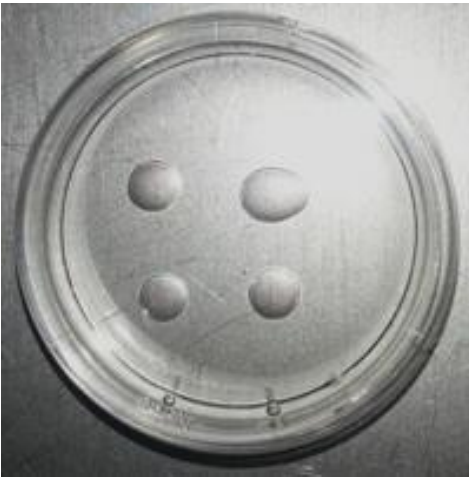
Her bir vaka için yumurta toplama işlemi sırasında ve işlem tamamlandıktan sonra aktarma işleminde kullanılmak üzere 2 adet 60 cm'lik kültür kabı kullanıldı. Her birine 3 adet 300 µl'lik CSCM mediumu havuzu yapıldı ve üzeri embriyo kültür yağı ile kapatıldı (Şekil 2).



Şekil 2: Yumurta toplama işlemi için hazırlanan kültür kabı

2.3.2. Hyaluronidaz (ayıklama) sonrası için kültür kabı hazırlığı

Her vaka için bir tane olmak üzere 60 cm'lik kültür kabına 4 adet 30 µl'lik CSCM mediumu damlacığı yapıp üzeri embriyo kültür yağı ile kapatıldı (Şekil 3).



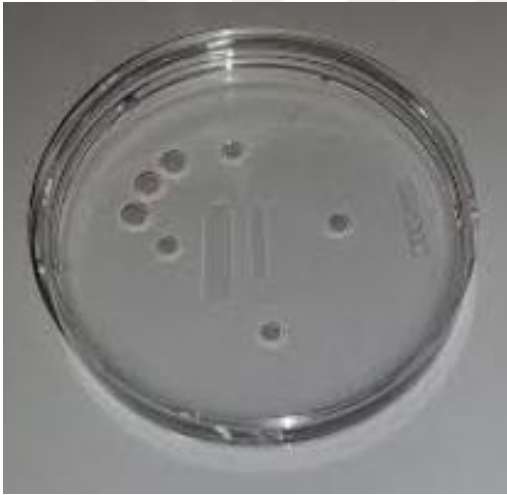
Şekil 3. Hyaluronidaz uygulaması için hazırlanan 4 damlacıklı kültür kabı

2.3.3. Hepesli medium hazırlığı

Konik tüp içerisine 9 ml mHTF mediumu ve üzerine 1 ml SSS (Serum Substitute Supplement, Sentetik Serum Katkısı) ilave edilerek hazırlandı.

2.3.4. IMSI Kültür kabı hazırlığı

Altmış ml'lik Falcon 353652 kültür kabının kapağına saat 3, 6, 9 ve 12 hizasına mII oositler için 5 µl'lik Hepesli medium damlacıkları hazırlandı. Saat 9 ve 12 hizasındaki damlacıkların arasına mII oositleri yıkama amaçlı 3 adet 10 µl'lik Hepesli medium damlacıkları hazırlandı. Merkezde boş kalan alanın sol tarafına 10 µl'lik sperm havuzu amaçlı 10 µl'lik Hepesli medium dikdörtgen şeklinde yayıldı. Sağ tarafa da 10 µl'lik %10'luk PVP (Polyvinylpyrrolidone) damlacığı dikdörtgen şeklinde yayıldıktan sonra üzeri yeteri miktarda embriyo kültür yağı ile kaplandı. En az 30 dakika 37°C'de etüvde bekletildi (Şekil 4).



Şekil 4: ICSI için kullanılan kültür kabı

2.3.4. Embriyo Kültür kabı hazırlığı

Her vaka için 0., 1., ve 3. Gün kullanılmak üzere toplamda 3 adet ve kullanımdan 1 gün önce hazırlanacak şekilde 60 cm'lik kültür kabına 18 adet 15 µl'lik CSCM mediumu damlacığı yapılarak üzeri embriyo kültür yağı ile kapatıldı (Şekil 5).



Şekil 5: Embriyo kültürü için kullanılan kültür kabı

Yukarıda hazırlık aşamaları detaylı olarak belirtilen kültür kapları vakada kullanılacakları günden bir gün önce hazırlandı. Hepseli medium içeren ICSI kültür kabı haricindeki kaplar kültür mediumunun gazlanması için kapakları yarı açık olarak %6 CO₂, %5 O₂, %95 nem ve 37°C sıcaklığa sabitlenmiş inkübatörlere yerleştirilerek gazlanmaları sağlandı. Ayrıca yumurta toplama işlemi sırasında gerekli olan mHTF mediumu her vaka için bir tane olmak üzere 25 cm²'lik flasklara 25 ml olarak bölünüp bir gün öncesinden 37° C 'ye ayarlı etüve konuldu.

2.4. Protokoller

2.4.1. Ovülasyon indüksiyonu protokolleri ve yumurta toplama işlemi (OPU)

Tüm hastalar menstrüel siklusun 2. veya 3.günü merkeze gelerek kan ve transvajinal ultrasonografik değerlendirmeleri yapıldı. Kanda progesteron düzeyi 1.5 ng/ml'nin altında ve transvajinal ultrasonografide kistik oluşum gözlenmeyen hastalara ovülasyon indüksiyon protokolü uygulanmaya başlandı. İndüksiyonun 6.günü antagonist (Cetrotide, Merck, İsveç) tedaviye eklendi ve hCG gününe kadar devam edildi. Hastalar belirlenen zamanlarda kan ve ultrasonografik olarak değerlendirildi ve 18mm ve üzeri 3 folikül görüldüğünde hCG (Ovidrelle Merck, İsveç) enjeksiyon saati verildi. Yumurta toplama işlemi (OPU) hCG enjeksiyonundan 35 saat sonra steril şartlarda,

genel anestezi altında, transvajinal ultrason eşliğinde aspirasyon cihazı, oosit toplama seti, oosit toplama iğnesi kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 6).

Transvajinal ultrason eşliğinde aspire edilen folikül sıvıları 37 dereceye ayarlı ısıtıcı tablada muhafaza edilen 15 ml'lik tüplere bir gün önceden hazırlanmış mHTF solüsyonu kullanılarak toplandı ve en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

Laboratuvara ulaştırılan folikül sıvısı yumurta toplama kabına dökülüp laminar flow kabin içerisinde stereo mikroskop altında kümülüs oosit kompleksi (KOK) varlığı açısından kontrol edildi. Bulunan KOK yapıları steril pastör pipet yardımıyla bir gün önceden hazırlanıp gazlandırılmış kültür kabına aktarıldı.



Şekil 6: OPU işleminde kullanılan cihazlar

2.4.2. Sperm örneğinin hazırlanması

Dansite Gradient (DG) yöntemi:

Yumurtaları aspirasyon yöntemi ile alınan hastanın eşi işlem gününde üzerinde adı soyadı eş-adı yazılı hasta protokolü ve barkodu olan steril sperm toplama kabı hastaya da okutulur ve kimlik kontrolü yapıldıktan sonra gerekli hasta bilgilendirmesi yapılarak örnek alımı için özel olarak tasarlanmış odaya alındı. Sperm örneği mastürbasyon yöntemiyle steril sperm kabının içerisine toplandı ve sperm verme odasını laboratuvar kısmına bağlayan ara bölme yardımı ile laboratuvara ulaştırıldı.

İşlemin yapılacağı sabah 2-8 °C’de bulunan sperm yıkama mediumu ve PureSperm ®-100 solüsyonları buzdolabından çıkartılarak oda ısısına gelmeleri sağlandı. Bu ürünler kullanılarak sırası ile %50, %70 ve %90’lık gradientler şeklinde, Tablo 5’te belirtildiği şekilde karıştırılarak hazırlandı.

Tablo 5: Sperm hazırlığı amaçlı gradient solüsyonlarının hazırlanışı

| | %50 | %70 | %90 |
|----------------------|------|------|------|
| Sperm yıkama mediumu | 5 ml | 3 ml | 1 ml |
| PureSperm-100 | 5 ml | 7 ml | 9 ml |

İşlem günü hastanın eşinden yukarıda bahsedildiği şekilde elde edilen sperm örneği, aşağıdaki aşamalar takip edilerek inseminasyon için hazırlandı:

- Sperm örneği, 30-40 dakikalık bir likefaksiyon süresi sonrasında iyice akışkanlık kazandığı gözlemlenerek makler kamerası ve mikroskop altında değerlendirildi ve androloji kayıt defterine sperm sayısı, hareketliliği, morfolojik değerlendirmesi not edildi.
- Daha önceden hazırlanmış olan gradient solüsyonları yardımı ile sperm yıkamada kullanılacak 3’lü gradient tabakası hazırlandı. Bu amaçla;
- 15 ml’lik Falcon 2095 konik tüp içerisine önce %90’lık olan mediumundan 0,5 ml tüpün dibine konuldu,
- Bu tabakanın üzerine, 0,5 ml %70’lik gradient mediumu cam pastör pipet ve enjektör yardımıyla çok yavaş bir şekilde bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirildi,
- Daha sonra %50 lik olan mediumdan 0,5 ml’lik bir kısım yine pastör pipet yardımıyla tüpün dibine yavaş bir şekilde konuldu ve böylece üçlü bir gradient hazırlandı.
- Ön incelemesi yapılmış olan sperm örneğinin 1-1,5 ml’lik kısmı, hazırlanmış olan bu üçlü gradient tabakası üzerine 45 derecelik açı ile steril pastör cam pipet ve pipetör vasıtasıyla konularak en üst kısımda yeni tabaka oluşturması sağlandı.
- Bu şekilde hazırlanan tüm ve örnek, 1300G’ de 20 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası yıkanarak ayrışan ve tüpün tabanında toplanan sperm, steril cam pastör pipeti ile ve enjektör yardımıyla çekildi ve ardışık 1700G’de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı.
- Sperm yıkama amacıyla, bir gün önce hazırlanmış olan gazlanmış CSCM mediumu kullanıldı.
- Yıkama sonunda elde edilen sperm hücreleri makler kamarası ve mikroskop yardımıyla değerlendirilerek androloji kayıt defterine kaydedildi.

Mikroakışkan-tabanlı sperm seçim (MASS) yöntemi:

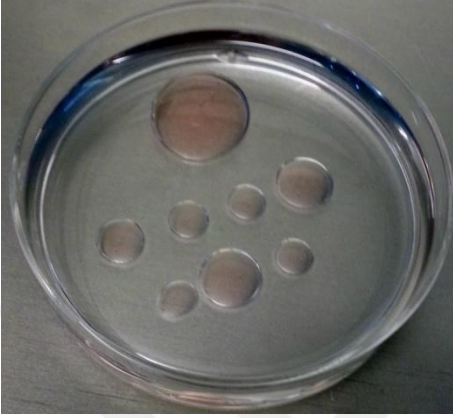
- Steril paketinden çıkarılan Fertile ® ürünü üzerine hasta kimlik bilgileri uygun şekilde yazıldı.
- Ürün üzerinde bulunan 5 kanalın giriş (Inlet) deliğinden 13 µl sorting solüsyonu yavaşça pipetlendi. Her ürün için ayrı sorting solüsyonu kullanıldı.
- Likefiye olmuş örnekten alınan 2 µl giriş deliğinden yavaşça pipetlendi.
- Çıkış (Outlet) deliklerine 2’şer µl, giriş deliklerine 1 µl mineral yağ damlatıldı.
- Hazırlanan ürün 36,5° C ‘de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası spermilerin konumu ve hareketliliği çalışmayı etkilemeden mikroskop altında incelendi. Spermilerin hareketleri yavaş ise inkübasyon süresi uzatıldı.
- Çıkış haznesinde birikmiş olan hareketli spermeleri barındıran sıvı dipten ve her bir kanaldan 2 µl ve toplamda $3 \times 2 = 6$ µl olacak şekilde mikropipet ile toplandı.

2.4.3. İnseminasyon öncesi hyaluronidaz (ayıklama) enzimi uygulaması

Hyaluronidaz uygulaması için kullanılan kültür kabı Şekil 7’de görülmektedir. Uygulamada kullanılacak medium 15 ml’lik mavi kapaklı konik falcon tüp içerisine 9 ml mHTF ve 1 ml SSS™ ilave edilerek hazırlandı ve işlem için planlanan zamandan en az 4 saat önce 37°C etüv içerisine konulup ısınması beklendi.

Bu şekilde hazırlanıp uygun sıcaklığa ulaşan medium ile hem ayıklama işlemi hem de IMSI işlemi için kullanılacak kültür kapları hazırlandı. Ayıklama için kullanılacak kültür kapları içerisine öncelikle enzim uygulamasında kullanılmak üzere 375 µl mHTF + 125 µl hyaluronidaz solüsyonu karıştırılarak enzim damlacığı hazırlandı. Bu

damlacığın yanına/etrafına mHTF mediumu kullanılarak 20 µl'lik 6-7 adet küçük damlacıklar (enzim uygulaması sonrası elde edilen oositlerin yıkanması ve enzimin uzaklaştırılması amacıyla) hazırlandı. Tüm damlacıklar hazırlandığında üzerleri embriyo kültür yağı ile kaplandı ve etüve konarak an az 30 dakika uygun sıcaklığa gelmesi ve dengelenmesi sağlandı.



Şekil 7: Hyaluronidaz uygulaması için kullanılan kültür kabı

2.4.4. IMSI uygulaması

IMSI işlemi öncesinde mikro manipülatöre oositi sabit tutma işinde kullanılan holding ve mikroenjeksiyon iğneleri takılarak işlem öncesi hazırlık yapıldı.

IMSI işlemi Hoffman modülasyonu olan inverted mikroskop kullanılarak gerçekleştirildi. İnseminasyon öncesi uygun şekilde hazırlanmış olan sperm örneği, bölüm 2.3.4'te anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan IMSI kültür kabı içerisinde yer alan PVP damlacığı içerisine pastör pipeti yardımıyla konuldu ve böylece IMSI sırasında oosit içerisine enjekte edilecek spermier seçilmek üzere hazırlandı. Uygun şartlarda ve sürede spermierin yüksek büyütme (6000x) altında seçilmesini ve immobilizasyon sonrası hazırlıklarını müteakip, oositler spermier bulunduğu kap içerisine hazırlanmış olan damlacıklara konuldu ve embriyolog tarafından her bir oosite 1 sperm enjekte edilecek şekilde mikroenjeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem bittikten sonra oositler vakit kaybetmeden 1 gün önceden hazırlanmış ve dengelenmiş olan standart embriyo kültür kaplarına, stereo mikroskop, pastör pipeti ve ağız pipeti yardımıyla her bir damlacık (drop) içerisinde 1 oosit olacak şekilde ve aktarıldı. Bu şekilde aktarımı yapılan kültür kabı inkübatör ortamına kaldırıldı.

2.4.5. Fertilizasyon ve ileri embriyo kültürü

İnseminasyon işlemlerinin yapıldığı günden bir gün sonra sabah saatlerinde (İnseminasyon sonrası 16.-20. Saatler) invert mikroskop kullanılarak fertilizasyon kontrolü gerçekleştirildi. MASS yöntemi ile DG yöntemi sonucunda normal fertilizasyon gözlenen (döllenen) oositler yeni hazırlanmış kültür kaplarına aktarılmak üzere ayrıldı. Yeni kaplara aktarılan döllenmiş oositler tekrar inkübatöre kaldırıldılar. Embriyolar transfer edilecekleri yada dondurulacakları güne kadar günlük olarak kontrol edildiler. Erken klivaj dönemi kontrollerinde embriyolar hücre sayıları, hücrelerin büyüklükleri, hücreler arası fragmantasyon yapılarının varlığı ve dağılımı vb. kriterlere göre değerlendirilerek kalite sınıflamaları yapıldı [11, 12]. Blastosist dönemi embriyolar sınıflandırılırken Gardner ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde kavite oluşumuna göre aşağıdaki şekilde değerlendirildi [13]:

- 1. Erken Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından daha az olan embriyolar,
- 2. Blastosist :Blastosel kavitesi embriyo volümünün yarısından fazla olan embriyolar,
- 3. Tam Blastosist: Blastosel kavitesi embriyo hacminin tamamını kaplayan embriyolar,
- 4. Ekspanse Blastosist: Blastosel kavitesi volümü iyice artmış, çap büyüyerek zonası iyice incelmış olan embriyolar,
- 5. Hatching Blastosist: Trofoektoderm hücrelerinin bir kısmı zonayı patlatarak dışarı çıkan embriyolar,
- 6. Full Hatching Blastosist: Tamamen zonasını terkeden embriyolar.

Embriyo dondurma: Embriyo transfer işlemi çeşitli nedenlerle yapılamayan yada Embriyo transfer işlemi takiben hastanın geride kalan embriyolarının belirli sayı ve kalite kriterlerinin karşılanması durumunda oda sıcaklığında ve soğuk zeminde dondurulması yapıldı.

Embriyo çözme: Embriyosu çözdürülecek hastaya ait hasta dosyası incelendi ve hastanın adı, soyadı, protokol numarası ve kaç tane embriyo dondurulduğu kontrol edildi.Embriyo çözme işlemi oda sıcaklığında ve soğuk zeminde gerçekleştirildi.

Embriyo transfer : Embriyo transfer sayısı ve günü hastanın klinik durumuna ve embriyoların kalitesine göre değerlendirildi.. Transfer edilecek embriyo seçimi çözme işleminden sonra ayrı bir CSCM içeren kültür kabına alındı ve steril olarak

hızlı bir şekilde embriyo transfer kataterine çekilerek ortalama 20-25 mikrolitre CSC ile hastaya transferi gerçekleştirildi.



3. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastalarda gerçekleştirilen 30 OPU siklusu sonrasında toplam 540 KOK elde edildi ve hyaluronidaz enzimi uygulaması sonrası elde edilen KOK'ların 439'unun mII aşamasında olduğu tespit edildi. Yöntem kısmında detaylı açıklandığı şekilde her bir vakada elde edilen mII oositler eşit sayılarda iki gruba ayrılarak iki farklı yöntem kullanılarak hazırlanmış spermiler ile insemine edildiler. Çalışma bitiminde MASS (n=217) ve DG (n=222) olarak iki farklı yöntemle insemine edilen oositler ve bu oositlerden elde edilen embriyolara ait gelişim özellikleri ve veriler toplanarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında elde edilen ve karşılaştırılan laboratuvara ait parametreler Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6: Gruplara ait laboratuvar gelişim parametreleri

| Parametreler | Grup I (MASS) | Grup II (DG) |
|-------------------------------------|------------------|--------------------|
| IMSI uygulanan mII oosit sayısı | 217 | 222 |
| Fertilizasyon oranı %, (n) | 73,7 (160/217) | 77,4 (171/221) (*) |
| 3.gün klinaj oranı %, (n) | 98,8 (158/160) | 99,4 (170/171) (*) |
| 3.gün grade I embriyo oranı %, (n) | 71,5 (113/158) | 74,7 (127/170) (*) |
| Blastosist oluşum oranı %, (n/ 2PN) | 45,8 (71/155) | 48,4 (78/161) (*) |

(*): $p > 0,5$

Tablo 6'da görüldüğü üzere, incelenen temel laboratuvar parametrelerine göre gerçekleştirilen karşılaştırmada iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Gerçekleştirilen 30 OPU siklusu sonrası tüm embriyoları dondurulan hastaların 26'sında (%86,6) dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferi (DÇET) gerçekleştirildi.

İki siklusta henüz embriyo transferi gerçekleştirilmedi. Bir siklusta embriyo biyopsi işlemi sonrasında genetik olarak normal embriyo bulunamadığından tedavi iptal edildi; 1 siklusta ise embriyolar blastosist aşamasına ulaşamadığından tedavi iptal edildi. DÇET gerçekleştirilen 26 siklusa ait klinik sonuçlar Tablo 7 'de görülmektedir.

Tablo 7: Sperm hazırlama yöntemine göre klinik ve canlı doğum sonuçları

| | Toplam | MASS | | DG | | MASS+DG |
|---------------------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | TET | İET | TET | İET | İET |
| ET yapılan siklus sayısı | 26 | 6 | 1 | 11 | 2 | 6 |
| <i>b-hCG+ gebelik % (n)</i> | 69.2% (18) | 3 | 1 | 9 | 2 | 3 |
| <i>Kese+ gebelik % (n)</i> | 65.4% (17) | 3 | 1 | 8 | 2 | 3 |
| <i>Missed abort</i> | 3 (17.6%) | 1 | - | 1 | - | 1 |
| <i>İmplantasyon oranı % (n)</i> | 57,1% (20/35) | | | | | |
| <i>Doğum</i> | 14 (53.8%) | 2 | 1 | 7 | 2 | 2 |
| <i>Tekiz</i> | <u>11(78.6%)</u> | <u>2</u> | <u>1</u> | <u>5</u> | <u>2</u> | <u>1</u> |
| <i>İkiz</i> | <u>3 (21.4%)</u> | - | - | <u>2</u> | - | <u>1</u> |

TET: Tek embriyo transferi; İET: İki embriyo transferi

Toplamda 26 DÇET sonrasında 18 b-hCG pozitif gebelik elde edildi (69,2% ET başına) ve 17 gebelikte kese gözlemlendi (65,4% ET başına). 17 klinik olarak konfirme edilen gebeliğin 3'ünde erken dönemde gebelik kaybı yaşandı ve 14'ü (11 tekiz, 3 ikiz gebelik) canlı doğuma ulaştı (53.8%). DG grubunda olup tek embriyo transferi sonrasında ikiz gebelik elde edilen iki olguda bebekler monokoryonik monoamniotik olarak sağlıklı bir şekilde doğdu.

DÇET sonuçları aynı zamanda transfer edilen embriyoların tek veya iki oluşuna göre ve MASS veya DG grubundan olup olmadığına göre değerlendirildi. Bilinen

implantasyon sonuçlarına göre (BİS) değerlendirildiğinde, 3 tekiz doğumun MASS-TET grubundan ve 1 bebeğin de birleşik grupta elde edilen ikiz gebelikten (dikoryonik diamniyotik) oluştuğu, toplamda MASS ile seçilmiş spermiler ile 4 sağlıklı doğum elde edildiği gözlemlendi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüz koşullarında YÜT uygulamalarında sperm hazırlama ve seçme amacıyla sperm yüzdürme veya birden fazla santrifüj aşaması gerektiren DG yöntemleri kullanılmaktadır. İlk uygulandığı 1993 yılından bugüne kadar mikroenjeksiyon tekniği ile milyonlarca bebeğin sağlıklı doğmuş olması, sperm hazırlamak ve seçmek için kullanılan adı geçen yöntemlerin etkin olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte yakın dönemde gerçekleştirilen birçok çalışmada seçilmiş spermatozoa'nın düşük DNA kalitesi ve yüksek DNA fragmentasyonuna sahip olabildiği bildirilmiştir [6, 14-16]. Mevcut sperm hazırlama ve seçme metodlarının yüksek DNA hasarı taşıyan spermiler verimli bir şekilde dışlayamaması nedeniyle, YÜT tedavilerinde beklenmedik şekilde karşılaşılan ve neden bulunamayan fertilizasyon başarısızlığı, düşük embriyo kalitesi ve/veya erken gebelik kayıpları gözlenen bazı vakalarda adı geçen olumsuz sonuçların sperm hazırlığı yöntemi ile ilişkilendirilmektedir [5, 17-19].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda santrifüj işlemleri uygulanmadığı için reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretiminden kaçınılabilmesi ve böylece daha düşük DNA hasarı gözlenen spermilerin elde edilmesine izin vermesi sayesinde sperm hazırlığında mikroakışkan yöntem kullanılması konvansiyonel sperm hazırlama yöntemlerine göre daha avantajlı olabileceği vurgulanmaktadır [7, 20-23]. Adı geçen çalışmalarda mikroakışkan yöntemler ile seçilen spermilerin kalitesinin mevcut konvansiyonel sperm hazırlama yöntemlerine kıyasla daha iyi olduğu belirtilmekle birlikte, bilebildiğimiz kadarı ile literatürde mikroakışkan teknolojisi ile hazırlanan spermilerin klinikteki olası etkinliğini gösterir herhangi bir klinik çalışma mevcut değildir. Mevcut çalışmamız sperm seçiminde rutin olarak kullanılan DG yöntemi ile MASS yönteminin kardeş yumurtalar kullanılarak etkinliklerinin laboratuvar ve klinik etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Çalışmamıza dünya sağlık örgütü kriterlerine göre normal konsantrasyon ve motilite değerlerine sahip olan fakat izole teratozoospermia gözlenen erkekler ve ovaryen stimülasyona normal yanıt veren kadınlardan oluşan çiftler dahil edilmiştir. Bu hasta grubunu seçmemizin nedeni düşük konsantrasyon ve motilite gözlenen erkeklerde belirgin oranda DNA fragmentasyonuna rastlandığından normal sınırlarda sayı ve hareketliliğe sahip olguların çalışmaya dahil edilmesi ile sperm hazırlama tekniğinden bağımsız yüksek DNA fragmentasyonu gözlenme olasılığını en aza indirmek, böylece çalışmada bu şekilde bir yanlılık oluşturma ihtimalini azaltmaktır. Yakın zaman önce Borges ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada gösterildiği üzere, çalışmamızda anormal sperm morfolojisinin olumsuz etkilerini azaltmak için IMSI yöntemi de kullanıldı [24].

Bugular kısmında yer alan Tablo 6'da gösterildiği üzere çalışmamızda elde edilen sonuçlar DG yöntemi ve MASS yöntemi ile elde edilerek seçilen spermlerin kardeş oositlerin inseminasyonunda kullanıldıklarında fertilizasyon aşamasından başlayarak blastosist aşamasına kadar benzer bir embriyo gelişim morfokinetiğine sahip olduklarını göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca izoleteratozoospermi tanısı konan grupta MASS teknolojisini kullanarak seçilen spermlerin kabul edilebilir gebelik ve doğum oranları oluşturduğu da gözlemlenmiştir (Tablo 7). Henüz öncül veriler olarak değerlendirilse de elde edilen bu sonuçlar MASS yönteminin izole teratozoospermia olgularında DG yöntemine başarılı bir alternatif olabileceğine işaret etmesi bakımından önemlidir.

Çalışmamızda ayrıca elde edilen olumlu bulgular yanında ileride Fertile® veya başka benzer MASS aparatları ile gerçekleştirilecek çalışmalara ışık tutması açısından bazı önemli konuların da ele alınması gerektiği sonucu ortaya çıkmıştır. İlk olarak, MFSS aparatının kullanımı kolay olmakla birlikte, farklı sperm kalitesi ve konsantrasyonuna sahip hasta gruplarında etkin kullanımı açısından detaylı bir standardizasyon gereksinimi olduğunu gözlemledik. Laboratuvarında yapmış olduğumuz öncül test çalışmalarında, oligoastenoteratozoospermi (OAT; <10 milyon sperm/ml, <20% total hareketlilik) vakaları ve şiddetli OAT vakalarında MASS yöntemi ile etkin bir sperm seçimi sağlayamadık (n=7; veriler gösterilmemektedir) ve bu sonuçlar bize Fertile® ürününün mevcut formunda bahsi geçen vakalardaki inkubasyon süresinin ve uygulama protokolünün optimize edilmesi gerekli olduğunu gösterdi. Bu yüzden, çalışmamızda adı geçen ürünün MASS yöntemi olarak yaygın ve etkin şekilde

kullanılabilmesi için yeni optimizasyon çalışmaları yapması gerekmekte olduğu sonucunu çıkardık. Ürünün daha etkin ve yaygın olarak kullanılabilmesi için ikinci önemli koşul mevcut kullanılan konvansiyonel sperm hazırlama yöntemlerine oranla daha az zaman harcaması gerekliliği idi. Aylık OPU sayıları fazla olan yoğun klinikler açısından daha kısa sürede ve etkin sperm hazırlığının ve seçiminin yapılması büyük önem taşımaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan dansite gradient yöntemi ile Fertile® ürünü ile gerçekleştirdiğimiz MASS yöntemi kıyaslandığında her iki yöntem de hemen hemen aynı zamanda sperm hazırlama olanağı sunmaktadır. Bu da yaklaşık 40 dakikadır. MASS aparatı kullanılarak vaka başına sperm hazırlamak için harcanan zamanın önemli ölçüde azalması embriyologların iş yükü açısından çok daha daha faydalı olacaktır. Bu senaryo göz önüne alındığında muhtemelen klinik açıdan farklı bir sonuç oluşturmayacak olsa bile yaratacağı zaman tasarrufu sayesinde MASS yöntemi yakın gelecekte ciddi ve önemli bir tercih sebebi olabilir. Ayrıca MASS kullanımının kolay olması ve tekrarlanabilen sonuçlar vermesi sayesinde teknisyen, malzeme ve solüsyon gibi değişkenlerden kaynaklanan hata ve işlem farklılıklarını ortadan kaldıracak için ek bir avantaj da sağlayacaktır.

Yaptığımız çalışmanın göze çarpan zayıflığı, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının sınırlı olmasıdır. Ancak, paylaştırılmış yumurta ve değerlendirmeye alınan embriyo sayısı laboratuvar sonuçlarının verimli ve anlamlı olarak değerlendirilmesi için yeterlidir. Yakın gelecekte MASS ile gerçekleştirilecek ve daha yüksek hasta sayılarının dahil edileceği yeni çalışmalar sayesinde adı geçen ürünün klinikte hangi hasta gruplarında nasıl bir performans göstereceği daha etkin olarak belirlenebilecektir.

5. KAYNAKÇA

1. Boivin, J., ve ark., *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care*. Hum Reprod, 2007. **22**(6): p. 1506-12.
2. Agarwal, A., ve ark., *A unique view on male infertility around the globe*. Reprod Biol Endocrinol, 2015. **13**: p. 37.
3. Palermo, G.D., ve ark., *ICSI: where we have been and where we are going*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(2): p. 191-201.
4. Henkel, R.R. and W.B. Schill, *Sperm preparation for ART*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 108.
5. Simopoulou, M., ve ark., *Improving ICSI: A review from the spermatozoon perspective*. Syst Biol Reprod Med, 2016. **62**(6): p. 359-371.
6. Zini, A., ve ark., *Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity*. Urology, 2000. **56**(6): p. 1081-4.
7. Aitken, R.J., ve ark., *The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies*. Mol Hum Reprod, 2013. **19**(8): p. 475-85.
8. Cho, B.S., ve ark., *Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm*. Anal Chem, 2003. **75**(7): p. 1671-5.
9. Schuster, T.G., ve ark., *Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics*. Reprod Biomed Online, 2003. **7**(1): p. 75-81.
10. Tasoglu, S., ve ark., *Exhaustion of racing sperm in nature-mimicking microfluidic channels during sorting*. Small, 2013. **9**(20): p. 3374-84.

11. Hardarson, T., ve ark., *Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation.* Hum Reprod, 2001. **16**(2): p. 313-8.
12. de los Santos, M.J., ve ark., *A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate.* Fertil Steril, 2014. **101**(4): p. 981-7.
13. Gardner, D.K., ve ark., *Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer.* Fertil Steril, 2000. **73**(6): p. 1155-8.
14. Ghaleno, L.R., ve ark., *Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: a flow cytometric study.* Arch Gynecol Obstet, 2014. **289**(1): p. 173-80.
15. Xue, X., ve ark., *Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients.* J Assist Reprod Genet, 2014. **31**(9): p. 1161-6.
16. Ricci, G., ve ark., *Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique.* Fertil Steril, 2009. **91**(2): p. 632-8.
17. Aitken, R.J. ve G.N. De Iuliis, *Origins and consequences of DNA damage in male germ cells.* Reprod Biomed Online, 2007. **14**(6): p. 727-33.
18. Wright, C., S. Milne, ve H. Leeson, *Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility.* Reprod Biomed Online, 2014. **28**(6): p. 684-703.
19. Ramos, L., ve ark., *Evaluation of ICSI-selected epididymal sperm samples of obstructive azoospermic males by the CKIA system.* J Androl, 2004. **25**(3): p. 406-11.

20. Asghar, W., ve ark., *Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species*. *Adv Healthc Mater*, 2014. **3**(10): p. 1671-9.
21. Simon, L., B.R. Emery, ve D.T. Carrell, *Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017. **44**: p. 38-56.
22. Nosrati, R., ve ark., *Microfluidics for sperm analysis and selection*. *Nat Rev Urol*, 2017. **14**(12): p. 707-730.
23. Shirota, K., ve ark., *Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage*. *Fertil Steril*, 2016. **105**(2): p. 315-21 e1.
24. Borges, E., Jr., ve ark., *Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcomes: the role of sperm preparation techniques*. *J Assist Reprod Genet*, 2013. **30**(6): p. 849-54.



T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: 29.12.2016/006
Konu: Moleküler Biyolog Berkay Akçay'ın etik
kurul kararı

İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :05.12.2016 tarihli yazınız

Koordinatörlüğünü Prof. Dr. Emir Tan'ın, sorumlu araştırmacılığını Moleküler Biyolog Berkay Akçay'ın üstlendiği Prof. Dr. Engin Oral'ın yardımcılığında gerçekleştirilecek olan "In Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Mikroakışkan Yöntemle Sperm Hazırlığının İnsan Embriyo Gelişimine Etkisinin İncelenmesi " başlıklı araştırma önerisi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 22 Aralık 2016 tarihinde toplanan Üniversitemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Prof. Dr. Mehmet Ünal
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

EK:
Etik kurul Değerlendirme Formu



GİRİŞİMSSEL OLMAYAN İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | Belge Adı | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili | | | |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|--|--|------------------------------------|--------------------------------|--|
| | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ | | | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> | |
| | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | | | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> | |
| | OLGU RAPOR FORMU | | | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> | |
| ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ | | | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> | | |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER | Belge Adı | Açıklama | | | | | |
| | SİGORTA | <input type="checkbox"/> | | | | | |
| | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ | <input checked="" type="checkbox"/> | | | | | |
| | BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU | <input checked="" type="checkbox"/> | | | | | |
| | İLAN | <input type="checkbox"/> | | | | | |
| | YILLIK BİLDİRİM | <input type="checkbox"/> | | | | | |
| | SONUÇ RAPORU | <input type="checkbox"/> | | | | | |
| | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ | <input type="checkbox"/> | | | | | |
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No: 006 | Tarih: 22.12.2016 | | | | | |
| | Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. | | | | | | |

| KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU | |
|---------------------------------|--|
| ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI | İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: | Prof.Dr. Mehmet ÜNAL |

| Unvanı/Adı/Soyadı | Uzmanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyet | | Araştırma ile ilişki | | Katılım * | | İmza |
|--------------------------------|-------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------|
| Prof. Dr. Gül BAKTIR | Farmakoloji | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi | E <input type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Prof. Dr. Ahmet KOROĞLU | Anestezi ve Reanimasyon | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi GOP Hastanesi | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Prof.Dr. Mehmet ÜNAL | Fizyoloji | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Prof.Dr. Ayşe KAFKASLI | Kadın Hastalıkları | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi GOP Hastanesi | E <input type="checkbox"/> | K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Doç.Dr. Tuba GÜNEL | Moleküler Biyoloji ve Genetik | T.C Istanbul Üniversitesi | E <input type="checkbox"/> | K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Doç.Dr. Ahmet MIDİ | Patoloji | Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi | E <input type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Yrd.Doç.Dr. Nürten DAYIOĞLU | Biyostatistik | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | E <input type="checkbox"/> | K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Yrd.Doç.Dr. Ayten ARIKAN | Tıp Tarihi ve Etik | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | E <input type="checkbox"/> | K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Yrd.Doç.Dr. Gökhan Yaşar DURAN | Hukuk | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Hukuk Fakültesi | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |
| Mustafa GÜMÜŞ | | Emekli | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> | |

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet ÜNAL
İmza:

Note: Etik kurul üyeleri her sayfaya imza atmalıdır.

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

| | |
|------------------|---|
| ETİK KURULUN ADI | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu |
| AÇIK ADRESİ: | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Gaziosmanpaşa Hastanesi Merkez Mah. Çukurçeşme Caddesi No:51 Gaziosmanpaşa İstanbul |
| TELEFON | (0212) 615 38 38 |
| FAKS | (0212) 615 38 49 |
| E-POSTA | yyuetikkurul@gmail.com |

| | | | | |
|-------------------------------|---|--|--|---------------------------------------|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | "In Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Mikroakışkan Yöntemle Sperm Hazırlığının İnsan Embriyo Gelişimine Etkisinin İncelenmesi" | | |
| | SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI | Moleküler Biyolog Berkay Akçay | | |
| | SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI | Moleküler Biyoloji | | |
| | KOORDİNATÖRÜN UNVANI/ADI/SOYADI | Prof. Dr. Emir Tan | | |
| | KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI | Mikrobiyoloji | | |
| | ARAŞTIRMA MERKEZİ | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Embriyoloji | | |
| | ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ | Maltepe mahallesi Yılanlı Ayazma Caddesi, No: 26 P.K. 34010 Cevizlibağ/Zeytinburnu/ İstanbul | | |
| | BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI | Istanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu | | |
| | DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ | Tamı Medikal Ürünler San.Tic.Ltd.Şti Sancak Mahallesi Turan Güneş Bulvarı, Korman Sitesi 51/J Çankaya/Ankara | | |
| | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ | Veysel Mete Elçi, Can Yalçın Sancak Mahallesi Turan Güneş Bulvarı, Korman Sitesi 51/J Çankaya/Ankara | | |
| UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI | UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> DOKTORA TEZİ <input type="checkbox"/> YÜKSEK LİSANS TEZİ <input checked="" type="checkbox"/> | AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/> YANDAL UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> DİĞER: <input type="checkbox"/> PROJE ÇALIŞMASI <input type="checkbox"/> | | |
| ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ | <input type="checkbox"/> FAZ 1 <input type="checkbox"/> FAZ 2 <input type="checkbox"/> FAZ 3 <input type="checkbox"/> FAZ 4 <input type="checkbox"/> Gözlemsel ilaç çalışması <input type="checkbox"/> Tıbbi cihaz klinik araştırması <input checked="" type="checkbox"/> In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları <input type="checkbox"/> İlaç dışı klinik araştırma <input type="checkbox"/> Anket çalışması <input type="checkbox"/> Retrospektif (geriye dönük) araştırma <input type="checkbox"/> Girişimsel (invaziv) olmayan klinik araştırma <input type="checkbox"/> Rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle (kan, idrar, gayta, doku, görüntü gibi) yapılan çalışma <input type="checkbox"/> Hemşirelik faaliyetlerinin sınırı içerisinde yapılan araştırma <input type="checkbox"/> Vücut fizyolojisi çalışması <input type="checkbox"/> Antropometrik ölçümlere dayalı çalışma <input type="checkbox"/> Yaşam alışkanlıklarının değerlendirilmesi çalışması | | | |
| ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ <input type="checkbox"/> | ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/> | ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLARARASI <input type="checkbox"/> |

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet ÜNAL
İmza:

(Handwritten signature of Prof. Dr. Mehmet ÜNAL)

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

05.12.2016

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL BAŞKANLIĞINA
İSTANBUL

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine devam etmekte olan 131102015 öğrenci No.lu Berkay AKÇAY'ın Yüksek lisans tezi için gerekli olan bilimsel çalışmalarını Bahçeci Fulya Tüpbebek Merkezi Embriyoloji Laboratuvarında gerçekleştirmesi etik kurul başvurusu ve izni doğrultusunda kullanılması kurumumuz açısından uygundur.

Saygılarımla,
Prof.Dr. Mustafa BAHÇECİ
Kadın Hast. ve Doğum Uzmanı
ÜYTE ÜNİTE SORUMLUSU
Prof.Dr. Mustafa Bahçeci

ÜYTE Merkezi Sorumlusu
Fulya Bahçeci Tüpbebek Merkezi