

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Nedeni Açıklanamayan İnfertilite Olgularında Sperm DNA Bütünlüğünün Fertilizasyon Başarısı ve Erken Embriyoner Gelişime Etkisi

Elçin TEZCAN¹, Işıl KASAPOĞLU², Gürkan UNCU², Berrin AVCI³

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

² Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Bursa.

³ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

İnfertilite olgularının yaklaşık %15'inde infertilite sebebi olabilecek bir patoloji saptanmayıp, açıklanamayan sebeplerle konvansiyonel gebelik gerçekleşmemektedir. Araştırmalar, sperm DNA hasarının türemeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) sonucunu olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. Çekirdek bütünlüğü korunmuş olan spermleri seçmeye yönelik non-invaziv yöntemler geliştirilmekle birlikte, bu yöntemlerin açıklanamayan infertilite olgularında ÜYT başarısı üzerindeki etkisi henüz tartışmalıdır. Bu çalışmada DNA hasarlı spermlerin dansite gradient santrifüjü (DG) yöntemi ile tek başına ve non-invaziv manyetik aktivasyonla hücre ayırma (MACS) yöntemiyle birlikte eliminasyonu sonrası kullanılan spermlerin fertilizasyon ve erken embriyoner gelişime etkisi karşılaştırılarak uygun semen hazırlama yönteminin saptanması hedeflenmiştir. Açıklanamayan infertilite tanısıyla ÜYT programına alınan çiftlerde, DG yönteminin tek başına ve MACS yöntemiyle birlikte kullanımının, kaliteli sperm elde etmedeki başarısı, her iki yıkama metoduyla elde edilmiş spermlerde TUNEL yöntemi ile DNA bütünlüğü açısından ve Hematoksilin Eosin boyamasıyla morfolojik açıdan değerlendirildi. Klinik parametrelere etkisini değerlendirmek amacıyla, her iki yıkama yöntemiyle elde edilen spermlerin ICSI sonrası fertilizasyon ve embriyo gelişimsel potansiyeline bakıldı. MACS+DG yöntemiyle yıkanan sperm örneklerinde sperm DNA fragmantasyon oranının ve vakuol (+) sperm oranının DG yöntemiyle elde edilen spermlere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. DG veya MACS+DG ile yıkanan spermlerle mikroenjeksiyonu gerçekleştirilen oositler arasında fertilizasyon ve embriyo gelişimsel potansiyelinde bir farklılık oluşmaması intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulamalarında spermin doğal seçiliminin söz konusu olmamasının bir sonucu olduğu düşünülerek, MACS tekniğinin ICSI protokollerinde gerekli olmadığı, spermin doğal seçiliminin gerçekleştiği intrauterin inseminasyon (IUI) ve IVF uygulamalarında daha etkin olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sperm DNA Hasarı. MACS. DG. TUNEL. Hematoksilin Eozin.

Effect of Sperm DNA Integrity on Fertilization Success and Early Embryonic Development in Unexplained Infertility Cases

ABSTRACT

In almost 15% of infertility cases infertility related pathology cannot be defined, and conventional pregnancy is prevented by unexplained factors. Investigations evidenced that sperm DNA damage adversely affects the outcome of assisted reproduction techniques (ART). Recently, non-invasive methods have been developed to select nucleus integrity protected sperm cells. However, the effects of these methods on unexplained infertility cases remain controversial. In this study the usage of density gradient centrifugation (DG) alone and together with magnetic activating cell sorting (MACS) for sperm separation were compared and the effect of selected sperm on embryonic development were investigated. In couples with unexplained infertility after DG and DG+MACS, sperm morphology and DNA quality were analyzed using TUNEL and Hematoxylin Eosin staining methods, respectively. Obtained sperms were followed up by ICSI to observe their potential for fertilization and embryo development. According to our findings, sperm DNA fragmentation and vacuole positivity were significantly lower in MACS + DG treated group as compared to DG treated group. There was no significant difference in fertilization and embryo development potential between oocytes microinjected with sperm washed with DG or MACS+DG which might be due to lack of natural sperm selection in intracytoplasmic sperm injection. Therefore, our data suggest that; MACS may be more effectively used for natural based sperm selection techniques, including; IUI and IVF, instead of ICSI.

Key Words: Sperm DNA Damage. MACS. DG. TUNEL. Hematoxylin Eosin.

Geliş Tarihi: 17.Şubat.2020

Kabul Tarihi: 14.Nisan.2020

Dr. Berrin AVCI
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD, Bursa.
Tel.:0532 564 99 07
Tel.: 0224 295 25 28
E-posta: berrin@uludag.edu.tr

Erkek infertilitesinin tanısında, World Health Organization (WHO)'nun belirlediği kriterler esas alınarak, sperm hücrelerinin konsantrasyonu, motilite oranı ve morfolojisinin değerlendirildiği rutin semen analizinden yararlanılmaktadır. Erkek infertilite olgularının büyük çoğunluğunda, rutin semen analizi bulguları ile fertilizasyon başarısı arasında bir korelasyon olduğu

gösterilmiş olmasına rağmen^{1,2} bu olguların bir bölümünde WHO'nun referans olarak belirlediği semen parametrelerinin normal sınırlarda olduğu gözlenmektedir olup, infertilite sebebi açıklanamamaktadır^{3,4}.

Başarılı bir fertilizasyon için sperm hücresinin sekunder oosite hasarsız bir çekirdek sunması gereklidir. Bu nedenle sperm DNA'sının kalitesi fertilizasyonun ve embriyoner gelişimin başarısına etki edebilmektedir⁵. Son yıllarda, açıklanamayan infertilite olgularında DNA bütünlüğünü koruyan spermlerin seçimini ve bu anomalilerin embriyo gelişimi ve gebelik üzerindeki etkisini azaltmayı hedefleyen yöntemler gerçekleştirilmektedir^{6,7}. Bu yöntemlerin açıklanamayan infertilite olgularında üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) başarısı üzerindeki etkisi hakkında farklı görüşler olmasına rağmen, sperm DNA hasarının ÜYT'yi olumsuz etkilediği konusunda fikir birliği sağlanmıştır⁸. Bu nedenle, son dönemde araştırmalar DNA hasarı olan spermlerin elenerek klinik kullanıma uygun, çekirdek bütünlüğü korunmuş olan spermlerin seçilmesini amaçlayan invaziv olmayan yöntemlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır⁸. Bu amaçla geliştirilen umut verici yöntemlerden biri Anneksin V ile konjuge manyetik aktiflenme ile hücre ayırma (MACS-Anneksin V) yöntemidir^{9,10}. DNA fragmentasyonu ejakulattaki abortif apoptotik spermlerin karakteristik bir özelliğidir^{11,12,13}. MACS-Anneksin V yönteminde, DNA fragmentasyonu olan apoptotik sperm hücrelerinin Anneksin V ile işaretlenmeleri ve Anneksin V ile konjuge olan manyetik boncuklar sayesinde bir magnete tutulu kalmaları sağlanmaktadır. Böylece magnete tutunmayan sağlıklı sperm hücrelerinin DNA fragmentasyonu taşıyan spermlerden ayrılarak toplanması sağlanabilmektedir^{14,15}. MACS-Anneksin V yöntemi in-vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında kullanılan standart yöntemler olan DG ve yüzdürme yöntemleri ile birlikte uygulandığında kaliteli sperm seçiminde ve implantasyon ve gebelik oranlarında artış olduğu ifade edilmiştir^{16,17}.

Bu çalışmada, açıklanamayan infertilite tanısı ile ÜYT programına alınan çiftlerde, DG yönteminin tek başına ve MACS-Anneksin V yöntemi ile birlikte kullanımının DNA bütünlüğü korunmuş, kaliteli sperm elde etmedeki başarısının ve bu yöntemle elde edilen spermlerin ICSI olgularında fertilizasyon ve erken embriyoner gelişim sürecine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hasta Populasyonu

Çalışmaya Kasım 2016- Ekim 2017 tarihleri arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (BUÜTF) Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYT) Merkezi'ne başvuran, kadın ve erkek partnerde infertilite sebebi olabilecek herhangi bir patoloji saptanmamış, kadın partner-

de metafaz II oosit sayısı en az 6 olan, oosit morfolojilerinin normal olduğu ve erkek partnerde sperm konsantrasyonu en az 15×10^6 /ml, motilitesi en az %40 ve normal sperm morfolojisi %1 ile %12 arasında olan 17 açıklanamayan infertilite olgusu dahil edildi. Olguların tamamı mevcut araştırmanın kapsamı ile ilgili açıklamaları içeren gönüllü olur formu ile bilgilendirilerek onayları alındı (BUÜTF 01.11.2016 tarihli ve 2016-18/35 nolu Etik Kurul onayı ile).

Spermlerin Hazırlanması

Ejakulatörnekleri masturbasyon yolu ile alındı ve likefaksiyonun gerçekleşmesi için 37°C'deki inkübatör içinde 30 dk bekletildi. "Makler sayım kamarası" kullanılarak sperm konsantrasyonu ve motilitesi değerlendirildi. Her bir olgunun ejakulat örneği, tek başına DG yöntemi ile yıkanmak üzere (Grup 1) veya MACS-Anneksin V ile birlikte DG yöntemi (MACS+DG) ile yıkanmak üzere (Grup 2) iki gruba ayrıldı. Her iki gruba ait spermler kardeş oositlerin döllenmesinde kullanıldı.

Ejakulattan dansite gradient (DG) yöntemi ile sperm eldesi için Grup 1'e ait numuneler likefaksiyon sonrası, Grup 2'ye ait numuneler MACS uygulaması sonrası %80 ve %40'luk konsantrasyonlarda "ISolate density gradient sperm separation solutions" (MILTENYİ BİOTEC) ile yıkandı. Ejakulat örneği ve gradient solüsyonları 500 xg'de 15 dk santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası tüpün dibinde kalan 1ml pellet 2 kez 2 ml G-IVF (VITROLIFE) yıkama solüsyonu eklenip, 300 xg'de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı. Pellet ICSI işlemine kadar 37°C'de, %98 nem, %5 O₂ ve %7 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edildi.

Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) Yöntemi ile Sperm Eliminasyonu

Grup 2'ye ait numuneler ejakulattın likefaksiyonunun hemen ardından, gradient solüsyonu ile yıkanmadan önce, $1-5 \times 10^7$ konsantrasyonundaki sperm örneği MACS® ART Annexin V System kullanılarak filtrasyondan geçirildi. 100 µl sperm numunesi 200 µl "Binding Buffer" ile seyreltilerek 300 xg'de 4 dk santrifüj edildi. Pelletin üzerine 10 µl "Annexin V Reagent" eklendi. Toplam hacim "Bindingbuffer" kullanılarak 50 µl'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilerek apoptotik sperm hücrelerinin manyetik olarak işaretlenmeleri sağlandı. Manyetik ayırımı gerçekleştirmek için MACS ART Column ve MACS ART Separation Unit (Miltenyi Biotec) kullanıldı. Sperm numunesi kolondan geçirilirken Manyetik olarak Anneksin V ile işaretlenmemiş olan geçiş fraksiyonu toplandı. Magnete asılı kalan işaretlenmemiş geçiş fraksiyonunun toplanabilmesi için kolon 50 µl "Binding buffer" ile yıkandı. MACS işleminden sonra, apoptotik olmayan sperm hücre süspansiyonu DG yöntemiyle yıkandı.

Sperm DNA Bütünlüğünün Erken Embriyoner Gelişime Etkisi

Spermilerin morfolojik analizi

DG (Grup 1) ve MACS+DG (Grup 2) ile hazırlanan sperm örneklerinden yayma preparat hazırlanarak, detaylı morfolojik değerlendirme için hematoksilen-eosin (H-E) boyaması ve DNA fragmantasyonunu değerlendirmek için Terminal deoksinukleotidil transferaz dUTP ile açık uç işaretleme(TUNEL) boyaması gerçekleştirildi. TUNEL boyamada In Situ Hücre Ölüm Tespit Kiti (Roche Molecular Biochemicals, Ref: 11684817910, ABD) kullanıldı ve boyama protokolü üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Sperm DNA fragmantasyonu indeksi yüzdesi (% DFİ), TUNEL pozitif boyanan sperm sayısı x 100) / (Toplam sperm hücre sayısı) formülü ile hesaplandı.

Oosit eldesi ve ICSI uygulaması

Her hastadan toplanan normal morfolojili metafaz II oositler randomize edilerek 2 gruba ayrıldı. Birinci grup oositlere, partnerinden alınan ve DG ile yıkanmış semen örneklerinden seçilen motil ve normal morfolojili sperm ile, ikinci grup oositlere ise MACS + DG yöntemi ile yıkanmış semen örneklerinden seçilen motil ve normal morfolojili sperm ile mikroenjeksiyon uygulandı.

Fertilizasyon ve erken embriyoner gelişimin değerlendirilmesi

ICSI sonrası oositler, parafin yağ ile kaplı erken dönem (klivaj) embriyo kültür medyumu (G1-VITROLIFE) droplarında %98 nem, %5 O₂ ve %7 CO₂ içeren inkübatör ortamında 18 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından oositler inverted mikroskop altında değerlendirilerek fertilizasyon değerlendirmesi yapıldı. Erkek ve dişi pronükleus gelişimi görülen oositler fertilizasyon pozitif olarak kaydedildi ve blastosit gelişim sürecine kadar embriyo kültürüne devam edildi (yumurta toplama işleminin ardından sonra 5+2 gün). ICSI sonrası 2. gün (klivaj aşamasında embriyo), 3. gün (klivaj aşamasında embriyo) ve 5. gün (blastosist aşamasında embriyo) embriyo gelişimi ve kalitesi inverted mikroskop altında değerlendirildi ve kaydedildi. Klivaj aşamasındaki embriyolar Rienzi ve ark.'nın¹⁸, blastosist aşamasında embriyolar Gardner ve ark.'nın¹⁹ tanımlamasına göre sınıflandırıldı.

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistik analizler SPSS ver.20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sperm örneklerinin DFİ değerleri arasındaki fark, bağımsız T testi ile, sperm DFİ değeri ve semen morfoloji parametreleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile saptandı. DGC veya MACS+DGC ile yıkamanın sperm parametrelerine ve morfolojisine etkisi Mann Whitney U test ile, fertilizasyon başarısına etkisi bağımsız T testi ile karşılaştırıldı. Tüm analizlerden elde edilen sayısal değerler ortala-

ma±standart sapma olarak ifade edildi. Tüm analizler %95 güven aralığında değerlendirilmiş olup, <0,05 olduğu belirlenen p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular ve Sonuçlar

Çalışmaya dahil olan kadın ve erkek hastaların demografik bilgileri Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. Çalışmaya dahil olan kadın ve erkek hastaların demografik bilgileri

Kadın hasta karakteristik özellikleri	Ort. Değer (min-max)	Standart sapma	Erkek hasta karakteristik özellikleri	Ort. Değer (min-max)	Standart sapma
Yaş	32,17 (24-38)	4,30	Yaş	34,94 (27-44)	4,65
BMI	25,49 (19-31,3)	3,35	BMI	27,48 (22-36)	4,24
AMH (ng/dl)	2,04 (1-7,20)	1,62	FSH (mIU/ml)	3,46 (0,55-5,88)	1,73
Antral follikül sayısı	11 (6-24)	4,27	Prolaktin (ng/ml)	7,00 (2,95-10,30)	2,80
FSH (mIU/ml)	4,97 (3-8,01)	1,26	Testosteron (nmol/L)	4,31 (2,43-7,33)	1,66
LH (mIU/ml)	4,1 (1,43-10,7)	2,86	Semen volümü (ml)	2,74 (1,50-4,50)	0,89
E2 (ng/ml)	41,32 (18-62,35)	12,38	Sperm sayısı/1ml ejakulat (10 ⁶)	52,82 (16,00-96,00)	22,19
Ovulasyon İndüksiyon Günü E2(ng/ml)	2453,12 (712-7416)	1981,93	Motilite (%)	71,18 (41-83)	11,89
Gonadotrofin Dozu (Unite)	230,41 (120-360)	81,08	TPMSS *(10 ⁶) (500 µl)	17,82 (5-27)	6,44
Toplanan oosit sayısı (OS)	12,23 (6-22)	4,94	Normal Sperm Morfolojisi (%)	3 (1-12)	2,62
Toplam matür oosit sayısı (MOS)	12 (6-20)	4,40			
İnfertilite süresi (yıl)	6,23 (1-12)	0,72			
Siklus sayısı	1,47 (1-3)	0,17			

*TPMSS: Total progressif motil sperm sayısı

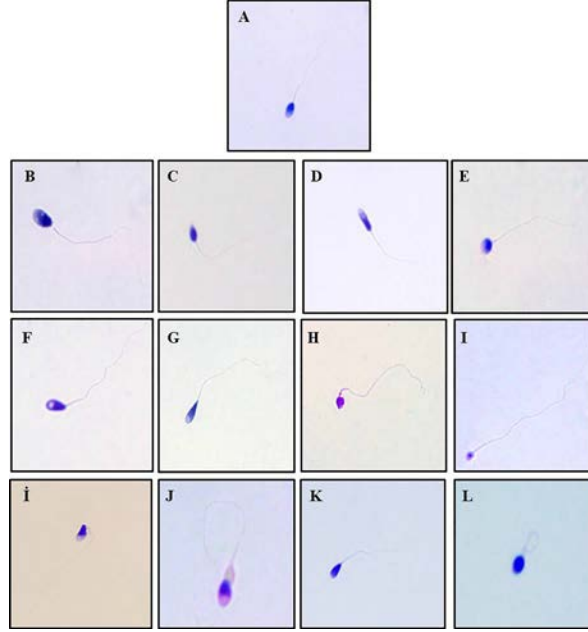
DG ve MACS+DG yöntemlerinin sperm parametreleri üzerine etkisi

H-E boyaması sonrası morfolojik analizde normal morfolojili sperm tanımlaması Şekil 1'de görüldüğü şekilde baş, boyun, kuyruk, sitoplazmik droplet, kırık boyun ve vakuol varlığı dikkate alınarak değerlendirildi.

DG yöntemi ile yıkanan sperm örnekleri, yıkama öncesi ile karşılaştırıldığında motilitesinin, toplam progresif motil sperm sayısı (TPMSS) ve normal morfolojili sperm sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü (Şekil 2, Tablo II). MACS-DG yöntemi ile yıkanan sperm örnekleri, yıkama öncesi ile karşılaştırıldığında sperm konsantrasyonunun azaldığı, normal morfolojili sperm sayısının ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (Şekil 2, Tablo II). MACS-DG yöntemi ile yıkanan sperm örneklerinde DG yöntemine göre sperm konsantrasyonunun ve toplam progresif motil sperm sayısının istatistiksel

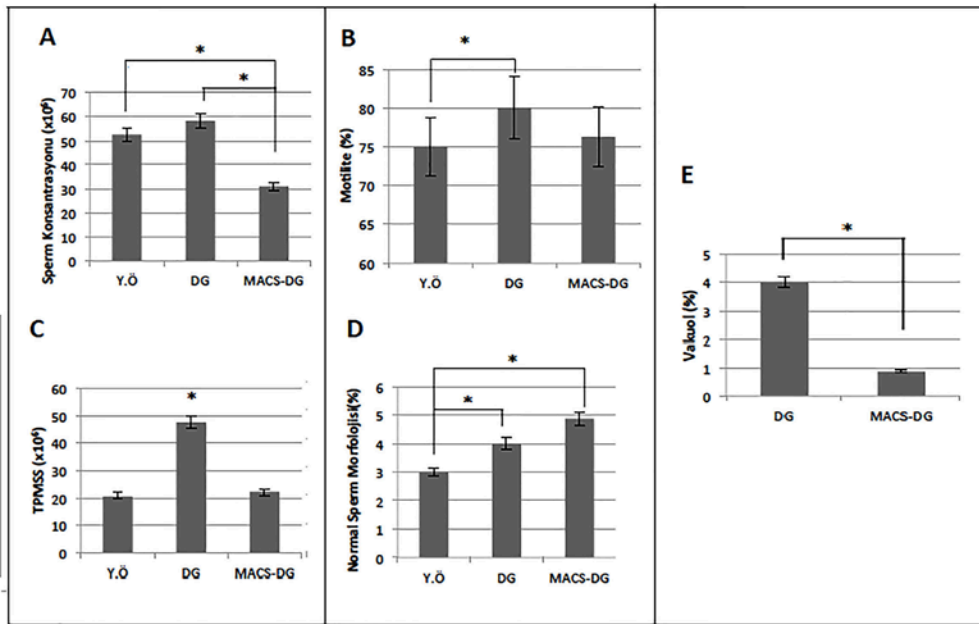
olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü (Şekil 2, Tablo II). MACS-DG yöntemi ile yıkanan numunelerde bir veya birden fazla ve sperm çekirdeğinin yaklaşık

1/3'ünü kaplayacak büyüklükte vakuol (+) sperm oranının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı, diğer anomalilerin benzer oranlarda olduğu saptandı (Tablo II).



Şekil 1.

Hematoxylin-Eosin boyaması sonucu gözlenen sperm morfolojileri (X100). A: Normal sperm morfolojisi, B–I: Baş anomalileri (B: Büyük baş, C: Küçük baş, D: Uzun baş, E: Yuvarlak baş, F: Vakuol, G: Priform baş, H: Amorf baş, I: Pinhead), J, K: Boyun anomalileri (J: Kırık boyun, K: Sitoplazmik droplet), L: Kuyruk anomalileri (L: Çift kuyruk, M: Kıvrık kuyruk).



Şekil 2.

Yıkama öncesi, DG ve MACS-DG yöntemleri ile yıkama sonrası sperm konsantrasyonu, motilitesi, total progresif motil sperm sayısı (TPMS) oranları, A-D: normal sperm morfolojisi. E: DG ve MACS+DG yöntemleri ile yıkanan sperm örneklerinde vakuol içeren sperm oranı.

Sperm DNA Bütünlüğünün Erken Embriyoner Gelişime Etkisi

Tablo II. DG ve MACS-DG'nin sperm parametrelerine ve sperm morfolojisine etkisi (n=17).

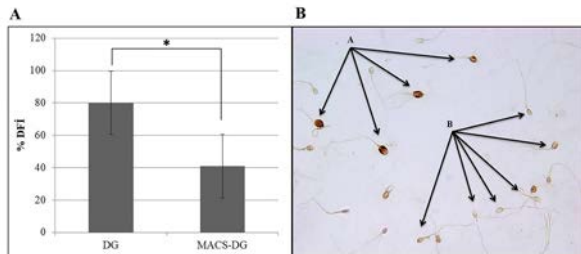
Semen parametresi		Ortalama (min-maks)	Standart Sapma	İkili karşılaştırma	
				YÖ-DG	p değeri*
Sperm/ml (x10 ⁶)	YÖ	52,58 (16-113)	29,15	YÖ-DG	0,95
	DG	58,11 (21-100)	25,50	YÖ-(MACS-DG)	<0,01
	MACS-DG	30,88 (10-60)	15,83	DG-(MACS-DG)	<0,01
Motilite (%)	YÖ	75 (41-83)	11,89	YÖ-DG	0,03
	DG	80 (45-96)	14,29	Y.Ö-(MACS-DG)	0,18
	MACS-DG	76,23 (33-100)	16,40	DG-(MACS-DG)	0,41
TPMSS(10 ⁶)	YÖ	20,76 (7-42)	10,18	YÖ-DG	<0,01
	DG	47,58 (16-80)	22,96	Y.Ö-(MACS-DG)	0,38
	MACS-DG	22 (5-83)	18,70	DG-(MACS-DG)	<0,01
Normal sperm morfolojisi (%)	YÖ	3(1-12)	2,62	YÖ-DG	0,02
	DG	4 (3-7)	1,27	Y.Ö-(MACS-DG)	<0,01
	MACS-DG	4,88(3-8)	1,45	DG-(MACS-DG)	0,31
Baş anomali (%)	DG	94,88(92-100)	2,20	0,66	
	MACS-DG	94,29(96-100)	1,64		
Boyun anomali (%)	DG	4,41(0-36)	2,06	0,79	
	MACS-DG	4,41(0-20)	1,57		
Kuyruk anomali (%)	DG	0,71(0-3)	0,25	0,27	
	MACS-DG	1,29(0-5)	0,36		
Sitoplazmik droplet (%)	DG	3,65 (0-30)	1,76	0,56	
	MACS-DG	3,59 (0-24)	1,59		
Kırık boyun (%)	DG	1,94 (0-13)	0,92	0,59	
	MACS-DG	4,94 (0-40)	2,42		
Vakuol (%)	DG	4,00 (0-11)	0,99	0,03	
	MACS-DG	0,88(0-5)	0,41		

*p ≤ 0,05 anlamlı kabul edildi.

YÖ=Yıkama öncesi, DG=dansite gradient grubu, MACS-DG=MACS+dansite gradient grubu

DG ve MACS+DG yöntemlerinin DNA hasarlı spermeliminasyonu üzerine etkisi

TUNEL analizi sonrası (Şekil 3); bağımsız T testine göre ejakulatın MACS-DG yöntemi ile hazırlanması sonrası sperm %DFİ'nin DG ile yıkanan spermle göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü (sırasıyla 41,00±18,67 (10-78), 80,12±14,48 (50-96);p< 0,01; Şekil 3A). DG ve MACS-DG uygulamaları sonrasında saptanan (%) DFİ oranları ile H-E boyamasında belirlenen anormal sperm morfoloji arasında anlamlı bir ilişkisi olmadığı görüldü (p>0,05).



Şekil 3.A:

DG (Grup 1) ve MACS-DG (Grup 2) yöntemlerinin sperm (%) DFİ oranına etkisi, B: TUNEL analizi sonucu (+) ve (-) olarak değerlendirilen sperm görüntüleri (X100). B_A: TUNEL (+), B_B: TUNEL (-).

DG ve MACS+DG yöntemlerininFertilizasyon Başarısı ve Embriyo Kalitesiuzerine etkisi

DG ve MACS-DG yöntemlerinin fertilizasyon başarısı, 2. ve 3. gün Grade 1 ve Grade 2 embriyoları ve blastosist gelişimi üzerine etkisi değerlendirildiğinde; Mann-Whitney U testine göre aynı hastanın DG ve MACS+DG ile yıkanan spermle mikroenjeksiyonu gerçekleştirilen oositleri arasında fertilizasyon (p=0,54), 2. gün Grade 1 ve 2 embriyo oranı (sırasıyla p=0,97, p=0,19), 3. gün Grade 1 ve 2 embriyo oranı(sırasıyla p=0,76, p=0,27) ve 1. ve 2. kalite blastosist gelişim oranı (sırasıyla p=0,59, p=0,76) açısından anlamlı bir fark görülmedi.

Tartışma

Bu çalışmada açıklanamayan infertilite tanısı ile ÜYT merkezinde ICSI programına alınan olgularda, semen materyalini dansite gradient yöntemi ile yıkamanın tek başına ve MACS yöntemi ile birlikte kullanımının fertilizasyon hızı ve kaliteli embriyo gelişimi üzerindeki etkisi ve iki farklı yıkama metodunun DNA bütünlüğü korunmuş, kaliteli sperm elde etmedeki başarısı karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. MACS yönteminin sperm DNA fragmentasyon oranını ve DNA fragmentasyonu ile korelasyon gösteren nükleer vakuol içeren sperm oranını düşürdüğü görülmekle birlikte, ICSI sikluslarında kullanımının fertilizasyon başarısına ve erken dönem embriyoner gelişime olumlu etkisi olmadığı görüldü.

IVF ve ICSI uygulamalarında yüksek sperm DNA hasarı ve abortif apoptoz oranının fertilizasyon başarısızlığı,embriyo gelişimsel potansiyelinde azalma, düşük oranlarında ve konjenital malformasyonlarda artış gibi çeşitli olumsuz sonuçlarla korelasyon gösterdiğiraporlanmıştır^{5,20,21}. Klinik başarı üzerine etkinliği açısından sperm DNA fragmentasyon oranı %9 ile %82 arasında oldukça geniş aralıkta verilmiştir²². Açıklanamayan infertilite olgularında, bazal semen parametreleri (konsantrasyon, motilite, total progressif motil sperm sayısı) normal olan hastalarda sperm DNA fragmentasyon oranının normal sınırların üzerinde olduğu bildirilmiştir^{3,4}. Çalışmamıza dahil edilen açıklanamayan infertilite olgularında saptanan 80,12±14,48 oranında sperm DNA fragmentasyonu literatür bilgisine göre klinik başarıyı olumsuz etkileyecek değer aralığındadır.

Sağlık Bakanlığının öngördüğü şekilde, total ileri progressif motil sperm sayısının 5 milyon ve üzerinde olduğu infertil çiftlerde 2 siklus intrauterin inseminasyon (IUI)uygulamasının başarısız olması durumunda IVF-ICSI uygulamalarına geçilmektedir (www.sgk.gov.tr). Spermatozoa çekirdeği DNA fragmentasyonu oranının yüksekliği IUI başarısızlığı ile direkt ilişkilidir^{23,24} ve IUI başarısı için sperm DFİ %11,5-30 arasında verilmiştir^{25,26,27}. IUI uygulama-

malarında kullanılan DG yöntemi semen konsantrasyonu ve progressif sperm sayısını azaltmakla birlikte total ve progressif motilite, normal morfolojili ve viabl hücre sayısını arttırdığı ve apoptotik-nekrotik sperm sayısını azalttığı için tercih edilen bir yıkama tekniğidir^{28,29,30}. Çalışmamız kapsamına alınan olgular DG yöntemi ile yıkanan semen materyali ile 2 siklus IUI başarısızlığı sonrası ICSI programına alınan olgulardır. Çalışma kapsamındaki olgularda DG yöntemi ile yıkama sonrası DFİ oranı %50-96 arasında saptanmıştır. Bu oran literatürde belirtilen oranın çok üzerinde olup, bu çalışma kapsamına alınan olgulardaki IUI başarısızlığını açıklamaktadır.

DNA bütünlüğünü koruyan spermilerin seçilmesi amacıyla MACS yönteminin kullanımı literatürde ağırlıklı olarak IUI olguları üzerindedir^{31,32}. ICSI uygulamalarında MACS yönteminin etkinliğini laboratuvar ve klinik parametreler açısından değerlendiren çalışmalarda mevcuttur. Bu çalışmalarda sperm yıkama yöntemi olarak MACS ardından DG, tek başına MACS yöntemi^{33,34,35,36,37} MACS sonrası swim-up^{32,38} veya DG sonrası MACS^{31,39,40} yöntemleri kullanılmış ve MACS ardından DG uygulamasının daha etkili olduğu raporlanmıştır. Ancak, literatürde MACS'ın standart yöntemlerle kombine edildiği sperm hazırlama yöntemlerinin %DFİ (DNA fragmentasyon indeksi) üzerindeki etkinliğini araştıran birkaç çalışma bulunmaktadır^{34,38,41,42,43}. Bu makaleler MACS yönteminin tek başına ya da diğer yıkama metodlarıyla kombine kullanımının semen parametrelerine etkinliği ile ilgili ortak bir görüş oluşturmamaktadır. Bu çalışmada aynı infertilite etyolojisine sahip olgularda MACS ardından DG yöntemi ile sperm hazırlığının anormal morfolojili ve/veya DNA hasarlı sperm eliminasyonuna ve fertilizasyon başarısı ile erken embriyoner gelişime etkisi birlikte değerlendirilmiştir. Cissen ve ark. sperm % DFİ oranlarının IVF ve ICSI sonrası gebelik başarısına etkisini değerlendirdikleri meta-analizde TUNEL ve Comet analizlerinin DNA kırıklarının saptanmasında daha yüksek spesifiteye sahip olduklarını ifade etmişlerdir²². Bu nedenle çalışmamızda sperm DNA hasarı TUNEL analizi ile değerlendirilerek her bir olguya ait % DFİ hesaplandı. Dirican ve arkadaşları ile Tavalee ve arkadaşlarının^{34,43} sonuçlarını destekler nitelikte, bu çalışmada da DG yöntemi ile yıkamanın sperm konsantrasyonu ve total progressif sperm sayısı açısından MACS-DG yöntemine göre daha etkin olduğu görüldü. DNA bütünlüğü bozulmuş spermilerin eliminasyonunda MACS-DG yönteminin %DFİ oranını %39,12 oranında azaltması ($p < 0,01$) ve normal morfolojili sperm oranlarını değiştirmemekle birlikte vakuol içeren sperm oranını azaltması ICSI'de DNA bütünlüğünü koruyan, normal morfolojili sperm sayısını ve seçilme şansını arttırabileceği yönünde yorumlanabilir. Fakat normal şartlarda ICSI uygulamalarında sperm seçiminde ilk kriterin sperm motilite ve morfolojisi olması ve fertilizasyonu gerçekleştirecek olan sperm in doğal seçiliminin ekarte edilmesi nedeniyle

MACS uygulamasının bu sikluslarda etkinliği tartışmalıdır. Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda fertilizasyon ve erken embriyoner gelişimde fark oluşturmaması bu görüşü destekler niteliktedir.

Sperm nükleusunda görülen vakuol sayısının ve büyüklüğünün DNA fragmentasyon oranı ile korele olduğunu vurgulayan çalışmalar mevcuttur^{44,45}. Normal baş morfolojisine sahip spermelerde vakuol varlığının sperm DNA fragmentasyonu açısından anlamlı olduğu, ağır teratozoospermik olgularda vakuol varlığının DNA bütünlüğünü koruyan spermi ayırt etmek açısından anlamlı olmadığı rapor edilmiştir⁴⁶. Bu çalışmada Kruger kriterlerine göre⁴⁷ yıkama öncesi ortalama normal morfolojili sperm oranı %1 ve 12 arasında olan semen örnekleri çalışıldı. MACS uygulamasının vakuol içeren sperm konsantrasyonunu azaltması ve buna paralel olarak sperm DNA fragmentasyon oranının da %40'a yakın oranda azalmış olması literatürdeki nüklear vakuol-DNA fragmentasyonu korelasyonunu destekler niteliktedir.

Rutin uygulamada sperm DNA bütünlüğünü değerlendiren testlerin kullanımına yönelik data yetersizdir. Yapılan çalışmalar tedavi sonuçlarını belirleyici nitelikte değildir. Belirsizliğin nedeni; çalışmaların çoğunun level 2 seviyesinde olması, örnek sayılarının kısıtlı olması, değişken hasta popülasyonunun değerlendirilmiş olması, kadın faktörünün kontrolünün eksik olması, metodların farklılığı ve zayıf istatistiksel metodolojilerdir⁴⁸. Olgu sayısının düşük olması ve klinik sonuçların değerlendirme kapsamında olmaması bu çalışmanın limitasyonları olmakla birlikte, infertilite etiyolojisi aynı olan hasta grubuna bakılmış olması, oosit kalitesinin standardize edilmesi ve iki yıkama metodunun sibling oositlere uygulanması sayesinde olası kadın faktörünün sonuca olumsuz etkisinin ekarte edilmesi çalışmanın olumlu yönleridir.

Sonuç olarak MACS yöntemi dansite-gradient yöntemi ile kombine edildiğinde sperm DNA fragmentasyon oranını ve DNA fragmentasyonu ile korelasyon gösteren nüklear vakuol içeren sperm oranını azaltmaktadır. Bu yöntemin fertilizasyon, implantasyon ve klinik gebelik başarısına etkisi fertilizasyonu gerçekleştirecek sperm in doğal seçiliminin sözkonusu olduğu IUI ve IVF uygulamalarında daha etkin olacağı, ICSI sikluslarında DNA bütünlüğü bozulmuş spermilerin eliminasyonunun fertilizasyon başarısını ve embriyo kalitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N et al Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. Fertil Steril 2006;85:629-634.
2. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG et al Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl 2000;21:145-153.

Sperm DNA Bütünlüğünün Erken Embriyoner Gelişime Etkisi

- Cynthia M Feijó, Sandro C Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. ANDROFERT, Andrology and Human Reproduction Clinic, Referral Center for Male Reproduction, Campinas, São Paulo, Brazil DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.09.002.
- Núñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C et al An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod Sci* 2012;19:1163-1168.
- Aitken RJ & Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011;13:36-42.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M et al Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;27:53-59.
- Delbes G, Hales BF, Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* 2010;16:14-22.
- Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* 2012;14(2):260-269.
- Almeida C, Sousa M, Barros A. (2009) Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2009;19(6): 770-777.
- Grunewald S, Paasch U. Sperm selection for ICSI using annexin V. *Methods Mol Biol* 2013;927:257-262.
- Kasai T, Ogawa K, Mizuno K et al. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 2002;4: 97-103.
- Taylor SL, Weng SL, Fox P et al Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 2004;10:825-834.
- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984-991.
- Glander HJ, Schiller J, Suss R et al Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lyso-phosphatidylcholines. *Andrologia* 2002;34: 360-366.
- Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2:127-133.
- Lukaszuk K, Wcislo M, Liss J et al First Pregnancy, Somatic and Psychological Status of a 4-Year-Old Child Born following Annexin V TESA Sperm Separation. *AJP Rep* 2015;5:105-108.
- Simopoulou M, Gkoles L, Bakas P et al Improving ICSI: A review from the spermatozoon perspective. *Syst Biol Reprod Med* 2016; 20:1-13.
- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, et al. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod.* 2002;17(7):1852-1855.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999;11(3):307-311.
- Beshay VE & Bukulmez O. Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24:172-179.
- Shamsi MB, Imam SN & Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:1073-1085.
- Cissen M, Wely MV, Scholten I et al Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016.11: e 0165125.
- Aziz N, Agarwal A. Evaluation of sperm damage: beyond the World Health Organization criteria. *Fertil Steril* 90:484-485;2008.
- Duran HE, Morshedi M, Kruger T et al Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update* 2002;8:373-384.
- Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology* 2012;1(3):357-360
- Thomson LK, Zieschang JA, Clark AM Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2011;96:843-847.
- Vandekerckhove FW, De Croo I, Gerris J. Sperm Chromatin Dispersion Test before Sperm Preparation Is Predictive of Clinical Pregnancy in Cases of Unexplained Infertility Treated with Intrauterine Insemination and Induction with Clomiphene Citrate. *Front Med (Lausanne)* 2016;23:3-63
- Fácio CL, Previato LF, Machado-Paula LA et al Comparison of two sperm processing techniques for low complexity assisted fertilization: sperm washing followed by swim-up and discontinuous density gradient centrifugation. *JBRA Assist Reprod* 2016;20:206-211
- Ricci G, Perticarari S, Boscolo R Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril* 2009;91(2):632-638.
- Karamahmutoğlu H, Erdem A, Erdem M et al The gradient technique improves success rates in intrauterine insemination cycles of unexplained subfertile couples when compared to swim up technique; a prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1139-1145.
- Khalid S & Qureshi I Pregnancy rate improves in couples with unexplained infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperm. *Fertil Steril* 2011;96:S25.
- Romany L, Meseguer M, Garcia-Herrero S et al Magnetic activated sorting selection (MACS) of nonapoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). *Fertil Steril* 2010;94:S14. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.391>
- Alvarez Sedo C, Uriondo H, Lavolpe M et al Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience. *Fertil Steril* 2010; s: 232. DOI:10.1016/j.fertnstert.2010.07.902.
- Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S et al 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.
- Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y et al Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:479-485.
- Troya J & Zorrilla I. Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. *JBRA Assist Reprod* 2015;19:66-69.
- Van Thillo G, Guidobono M, Young E et al Biological safety and live births after selection of non-apoptotic spermatozoa during ICSI. *Fertil Steril* 2011; 96:160-161.
- Nadalini M, Tarozzi N, Di Santo M & Borini A Annexin V magnetic activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one? *J Assist Reprod Genet* 2014;31: 1045-1051.
- Khalid S & Qureshi I Effect of magnetic selected sperm on fertilization and embryo development: an animal model study. *Fertil Steril* 2011;96:S169.
- Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedo C et al Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010;20:320-323.
- Berteli TS, Da Broi MG, Martins WP et al Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves re-

- covery of high-quality spermatozoa. *Andrology* 2017; 5:776-782.
42. Bucar S, Gonçalves A, Rocha E et al Sá R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet* 2015;1:147-154.
 43. Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M & Nasr-Esfahani MHDensity gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2012;29:31-38.
 44. Hammoud I, Boitrelle F, Ferfourri F, et al Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. *Andrologia*. 2013;45(3):163-170.
 45. Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P et al An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay. *Andrology* 2017;5:392-8
 46. Lavolpe M, Lorenzi D, Greco E, Nodar F, Alvarez Sedó C. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. *JBRA Assist Reprod* 2015;19(2):70-74.
 47. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, et al Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986;46(6):1118-1123.
 48. Hornstein MD State of the ART: Assisted Reproductive Technologies in the United States. *Reprod Sci*. 2016;23:1630-1633.