

IUI ve IVF İçin Sperm Hazırlama Yöntemleri

Sperm Preparation Methods for IUI and IVF

Sinan ÖZKAVUKÇU,^a Duru ARAS^a

^aKadın Hastalıkları ve Doğum AD, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

ÖZET

Ejakulattan spermelerin başarıyla izolasyonu ve en kaliteli spermelerin seçilmesi için uzun yıllardır kullanılan birkaç temel teknik mevcuttur. Bu teknikler genel olarak bir sperm popülasyonunun seçilmesine yönelik olarak yapılan uygulamalardır. Bir araya getirilmiş kaliteli sperm toplulukları IUI ya da klasik IVF için kullanılır ve sperm in oosite penetrasyonu beklenir. Daha ileri aşamada ise ICSI ile her bir oositin inseminasyonunda kullanılacak spermelerin tek tek seçimi söz konusudur. En kaliteli sperm in inseminasyonda kullanılması, en kaliteli embriyonun oluşturulmasına ve hastaların üremeye yardımcı tekniklerden en üst düzeyde faydalanmasına yol açacaktır. Sperm çalışmalarında akılda tutulması gereken en önemli realite heterojenitesidir. Her bir bireyin değişik dönemlerde farklı sperm parametrelerine ve üreme sistemi patolojilerine sahip olması mümkün olabileceği gibi, her bir ejakülatta da çok çeşitli patolojiler içeren ve normal olan spermeler mevcuttur. Bu heterojeniteye yayınlanan bilimsel verileri de etkilemektedir. Bu bilgiler ışığında temel bazı sperm seçme yöntemlerine ve bunların kombine kullanımına üstünlüğü açıkça ortaya konmadıkça yeni teknolojilerin kullanılmasında tedbirli davranmak hem etik hem de maliyet-fayda açısından uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sperm, dansite gradiyent santrifüjasyon, swim-up, MACS, PICSI

ABSTRACT

There are a few basic techniques that have been used for many years to successfully isolate ejaculated, highest quality sperm. These techniques are generally applied to select a cohort of spermatozoa. Selected cohort is used for IUI or conventional IVF and sperm oocyte penetration is expected. At a further stage, there is an individual sperm selection for ICSI to be used for the insemination of each oocyte. The use of top-quality sperm insemination will lead to the creation of the highest quality embryo and to the utmost patients' benefit from assisted reproduction technology. The most important reality that must be kept in mind in andrology studies is heterogeneity. It is possible that each individual has different sperm parameters and reproductive system pathologies at different times, and each ejaculate contains normal spermatozoa as well as sperm with various pathologies. This heterogeneity also affects published scientific data. Unless explicitly stated that a new technique is superior to some basic sperm selection methods and their combined use, it would be both ethical and cost-effective to be cautious in adapting new technologies.

Key Words: Sperm, density gradient centrifugation, swim-up, MACS, PICSI

TJRMS 2017;1(2):92-8

Erkek üreme hücresi olan sperm, ejakülasyonu takiben, kadın genital sisteminde etkin bir seçilime maruz kalır. Yumurtayı döleyip, yeni bir bireyin genomuna katkı sağlayacak tek

bir tanesi, ejakülatla atılan milyonlarca elendikten sonra, in vivo koşullarda servikal mukustan süzülerek fertilizasyonun gerçekleşeceği Fallop tüplerine ulaşır. Vajene atılan on milyonlarca

Geliş Tarihi/Received: 21.12.2016

Kabul Tarihi/Accepted: 30.12.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:

Sinan ÖZKAVUKÇU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY
sinozk@gmail.com

Copyright © 2017 by Üreme Tıbbı Cerrahi Eğitim Araştırma ve Uygulama Vakfı

spermden uterusa yüz binlercesi, fertilizasyonun gerçekleşeceği ampulla bölgesine ise ancak yüzlercesi ulaşmaktadır. Koitus sonrası Fallop tüplerinden yapılan örneklemelerde, bu bölgeye ulaşan spermelerin iyi morfolojiye sahip oldukları izlenmiştir. Üremeye Yardımcı Tedavilerde (ÜYT) kullanılan sperm hazırlama yöntemleri de in vivo koşulları taklit ederek in vitro koşullarda kaliteli sperm seçimini, bir başka deyişle fertilizasyon kapasitesi düşük spermleri elemeyi amaçlar. Spermin fertilizasyon kapasitesini belirleyen en önemli iki parametre morfoloji ve hareketliliğidir.¹ Ayrıca son yıllarda spermlerdeki radikal oksijen türevlerinin varlığı, DNA fragmentasyonu, apoptoz ve mitokondrial zar potansiyelinin önemini gösteren çalışmalar da dikkat çekmektedir.²⁻⁴ Sperm hazırlama protokolleri ile baş, boyun veya kuyruk anomalisi göstermeyen, ileri hızlı hareketli spermleri elde etmek mümkün olabilmektedir.⁵ Bu doğrultuda ÜYT merkezlerinde geniş kullanım alanı bulan rutin sperm hazırlama protokolleri yıkama, swim-up (SU, yukarı yüzdürme) ve dansite-gradyent santrifügasyon (DGS) yöntemleridir. Basit tanımıyla yıkama, sperm hücrelerinin seminal plazmadan uzaklaştırılmasıdır. Yıkama işlemi ejakülasyonu takip eden 1 saat içerisinde yapıldığı takdirde seminal plazmada bulunan diğer hücreler, ölü sperm hücreleri, çözünmüş halde bulunan prostoglandinler ve çinko gibi çeşitli maddeler, bakteri ve virüsler gibi enfektif ajanlardan kaynaklanabilecek zararlı etkiler en aza indirilmiş olur.^{6,7} Uygulanacak sperm hazırlama protokolünün seçiminde semen analizi kritik önem taşır. Örneğin; normozoospermik hastalarda hem SU, hem de DGS yöntemiyle yeterli sayıda ileri hızlı hareketli sperm elde edilirken, oligoastenoospermi vakalarında dansite-gradyent yöntemiyle elde edilen hareketli sperm sayısı daha yüksektir.^{8,9} Semen örneği alındıktan sonra likefaksiyon için geçen zamanın uzaması semen kalitesinin iyi olmadığını düşündürür. Bir saatin üzerindeki likefaksiyon süreleri mutlaka raporlanmalı ve gerekirse likefaksiyonu kolaylaştırıcı yöntemler kullanılmalıdır.¹

Normal spermiyogram kriterleri Dünya Sağlık Örgütü tarafından ejakülat hacmi 1,5 ml ve üzerinde, toplam sperm sayısı en az 39 milyon, mili-

litre başına sperm sayısı en az 15 milyon, toplam hareketlilik oranı en az %40, ileri hızlı hareketlilik oranı %32, canlılık oranı en az %58 ve normal morfoloji oranı en az %4 olarak tanımlanmıştır.¹ Oligozoospermi, astenoospermi ve teratoospermi sırasıyla konsantrasyon, hareketlilik ve morfolojinin referans limitlerin altında olduğu koşulları tanımlar. Tanıya uygun doğru yaklaşımın belirlenmesinde ise, sperm seçim yöntemlerinin uygulama esaslarının iyi anlaşılması ve yöntemler arasındaki farklılıkların neden-sonuç ilişkileri çerçevesinde değerlendirilmesi şarttır. Bu derlemede sperm kalitesiyle ilişkilendirilen yeni teknolojiler ele alınarak hızla yaygınlaşan kişiye özel tedavi yaklaşımlarının daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır.

Tüm sperm hazırlama protokollerinde içerikleri in vivo ortamı taklit edecek şekilde düzenlenmiş tuz solüsyonları kullanılır. Günümüzde, spermlerin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarını tamamlamalarını sağlayacak özellikte, sperm motilitesini olumsuz yönde etkilemeyen ve uygun tamponlamayla pH dengesi sağlanmış kültür ortamları ticari olarak elde edilebilmektedir.

YIKAMA

Bu yöntemde temel amaç spermatozoanın seminal plazmadan uzaklaştırılarak istenilen bir hacimde yoğunlaştırılmasıdır. Bu amaçla konik dipli steril santrifüj tüpleri kullanılır. Tüplerin santrifügasyona uygun üretilmiş olmaları biyogüvenlik açısından büyük önem taşır. Birebir oranında kültür çözeltilisiyle seyreltilen likefiye olmuş örnek, 400 g'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj devri ve süresi ÜYT merkezleri arasında farklılık gösterebilir. Burada temel prensip santrifüj sırasında reaktif oksijen radikallerinin (Reactive Oxygen Species; ROS) açığa çıkmasını engelleyecek optimal devir ve sürenin belirlenmesi olmalıdır. Yüksek konsantrasyonda lökosit içeren ya da ROS yükseklığı açısından riskli olan semen örnekleri için daha farklı protokoller izlenebilir.¹⁰ Seminal plazmanın uzaklaştırılmasının ardından pellete taze çözelti eklenerek yıkama işlemi tekrarlanabilir. Elde edilen pellet düşük hacimde (~0,5 mL) kültür sıvısı içinde pipetajla kaldırılır. Yıkama yöntemi SU, DGS, man-

yetik hücre ayırıştırma gibi farklı sperm hazırlama protokolleriyle kombine olarak uygulanılabileceği gibi, normozoospermik vakalarda tek başına hızlı IUI uygulamaları için de kullanılabilir. Semen ilk değerlendirilmesinde sperm izlenmeyen vakalarda, pelletin tanı amaçlı incelenmesinde mutlaka santrifüjle çöktürme uygulanmalıdır. İlk incelemede sperme rastlanmamasına rağmen yıkama sonrasında sperm izlenmesi durumu kriptozoospermi olarak adlandırılır ve kesin azoospermi teşhisinden önce mutlaka değerlendirilmelidir.¹

SWIM-UP

Basit tanımıyla spermatozoanın motilitesinden faydalanılıp, hücrelerin belli bir sıvıda toplanarak seçilmesi esasına dayanır. Yıkama aşamasından geçirilmiş örnekler düşük hacimde dilue edilerek steril tüplere alınır. Hazırlanan sperm süspansiyonu üzerine yaklaşık 1 mL kültür sıvısı yerleştirilir. Kültür sıvısı tüpün dibine de yerleştirilebilir. Bu durumda yöntem aşağı yüzdürme (swim-down) adını alsa da temel prensip aynıdır. Her iki yöntemde de sıvıları birbirine karıştırmayarak katmanlar oluşturulması önemlidir. Katmanlamanın ardından örnek, yüzey alanını artıracak şekilde 45° eğimle, 37°C'de ve 1 saat süreyle inkübe edilir. Normozoospermik hastalarda ileri hareketli spermelerin temiz kültür sıvısının üst ¾'lük kısma yüzmesi beklenir. Elde edilen sperm hücreleri intrauterin inseminasyonda (IUI) kullanılabilceği gibi, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda da (ICSI) kullanılabilir. Aynı yöntem santrifüj sonrası pellet kaldırılmadan, dikkatli şekilde üzerindeki sıvı sütununun tazelenmesiyle de yapılabilir. Bu durumda santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılır ve yerine dikkatlice taze sperm medyumundan 0,5-1 mL kadar eklenir. Hazırlanan tüpün yeterli sürede inkübasyonu sonrasında hareketli spermeleri içeren süpernatant yeni bir steril tübe aktarılır ve işlem zamanına kadar bekletilebilir. SU yönteminde inkübasyon süresi sperm hazırlığının ne amaçla yapıldığına bağlı olarak ve bazal sperm parametrelerine göre modifiye edilebilir. ICSI için hazırlanan örneklerde, hareketlilik oranları normal sınırlardaysa, pellet üzerine yayılan medyum hacmi ve inkübasyon süresi minimal tutularak ICSI

için yeterli miktarda, daha konsantre ve iyi hareketlilik oranlarına sahip bir spermatozoon süspansiyonu elde edilebilir. İnkübasyon süresinin uzaması, pelletin işlem sırasında ajite edilmesi, süpernatant geri çekilirken dikkatli olunmaması gibi durumlarda, istenmeyen hücrelerin eldesi de mümkün olabilir. SU yöntemleri oligoteratozoospermik hastalarda sınırlı sayıda sperm eliminasyonuna imkân vermektedir. Bu olgularda kültür sıvısı miktarı düşürülebileceği gibi, inkübasyon süresi de uzatılabilir. Hareketlilik parametrelerinde bir anormallik yoksa oligozoospermi vakalarında da, ICSI/IVF siklusları için SU yöntemini kullanmanın bir sakıncası yoktur. **Migrasyon sedimantasyon**, SU tekniğine dayanan ve normozoospermik hastalarda uygulanması son derece pratik ve ofis kullanımına uygun olan bir yöntemdir. Geleneksel swim up prosedürünün aksine spermatozoa direk olarak likefiyeye olmuş semenden elde edilir. İç içe geçmiş iki tüpten ibaret olan özel bir malzeme ile (RI MSC, Research Instruments, Cornwall, Birleşik Devletler) santrifüj işlemlerine gerek kalmadan yeterli sayıda hareketli, DNA fragmentasyonu ve persiste histon varlığı düşük, iyi morfolojide sperm eldesi mümkün olup karşılaştırıldığı temel tekniklerle benzer sonuçlar ortaya koymaktadır.¹¹

DANSİTE GRADİYENT SANTRİFÜGASYON

DGS yönteminde ejakülat steril konik bir tüp içerisinde farklı yoğunluktaki sıvı katmanlardan oluşturulan bir sütun üzerine yayılır. Bu sıvılar tek katman şeklinde olursa devamlı (continuous), birden fazla katmanın üst üste hazırlanması durumunda devamsız (discontinuous) gradiyent santrifügasyon olarak isimlendirilir. Katmanlar arasındaki yoğunluk farkı silan kaplı kolloidal silika partikülleri içeren ve günümüzde pek çok farklı ticari şekli bulunan kültür sıvılarının farklı derişimleriyle sağlanır. Bu yöntemde ayırım, hücre ve/veya diğer partiküllerin yoğunluk farklarına göre, santrifüj kuvvetine karşı gradiyent sıvılarının gösterdiği direnç ile ortaya çıkar. Normal morfolojiye sahip ve ileri hızlı hareketli sperm hücrelerinin, sitoplazma içerikleri daha az olduğundan (daha olgun), oluşturulan farklı yoğunluktaki katmanlardan geçerek konik tüpün dip kısmına ulaşması bek-

lenir.¹² En kaliteli spermeleri elde edebilmek için konik tüpün en alt katmanı en yoğun katman olarak belirlenmelidir. Buna göre sıklıkla tercih edilen yoğunluk kombinasyonları literatürde yüksek fertilizasyon ve gebelik oranlarıyla karakterize olan 40/80 veya 50/90'dır. Bu şekilde elde edilen spermelerin morfolojik açıdan ve DNA bütünlüğü açısından, SU'a üstünlüğünü gösteren yayınlar olsa da, bu iki temel metodun benzer sperm seçme kapasiteleri olduğu söylenebilir.^{4,8,13-18} Ancak DGS yönteminin uygulanmasında mutlak endikasyon oluşturan durumlar vardır. Bunlardan en sık başvurulana testiküler sperm ICSI öncesi hazırlanmasıdır. Testiküler kaynaklı sperm hazırlığında tübüllerin parçalanarak içeriğindeki germinal seminifer epitelin ortaya çıkarılması sırasında pek çok hücre tipi, hücre artığı, döküntü ve bağ dokusu komponenti de açığa çıkmaktadır. DGS bu vakalarda istenmeyen doku artıklarını ve visköz doku aralığı elemanlarını elimine etmesi açısından değerlidir.¹⁹ Testiküler dokunun hazırlanmasında elimine edilemeyen hücreler; spermle benzer yoğunlukta ve büyüklükte bulunan eritrositler, lenfositler ve küçük yuvarlak spermatidlerdir. Eritrositlerin cerrahi girişim nedeniyle yüksek miktarda olması spermle hazırlanan örnekte tespit edilmesinde zorluklar yaratabilir. Yalancı negatif sonuçlardan kaçınmak amacıyla uygun bir eritrosit lizis tamponu kullanılarak bu sorun aşılabılır.²⁰ DGS'nin mutlak endikasyon olduğu bir diğer durum da HIV, HBV ve HCV gibi viral hastalıklar açısından seropozitif erkeklerden alınan ejakülatların hazırlanmasıdır. Çalışmalar uygun şekilde yapılan DGS uygulamasının bu hastaların ejakülatlarındaki viral yükü ortadan kaldıracak kadar başarılı olduğu yönündedir ve gerek IUI gerekse de ICSI/IVF siklusları için kullanılabilir.⁷ Bu vakalarda gradyent sütunlarının 3 katmanlı şekilde hazırlanması önerilmektedir. Hafif erkek faktörü olarak kabul edilen, toplam motil sperm sayısının 5-15 milyon aralığında ve ileri hareketliliğin düşük olduğu vakalarda katmanlar 0,5 mL hacimle sınırlandırılmalıdır (mini gradyent olarak da isimlendirilir). Tüm vakalarda, elde edilen sperm hücrelerinin silika partiküllerinden uzaklaştırılması için kültür sıvısıyla yıkama yapılmalıdır.

Bu ek yıkamanın santrifüj sayısını artırması nedeniyle ROS oluşumuna katkı sağladığı belirtilmektedir. Testis biyopsisi ile elde edilen sperm hücrelerinde karşılaşılan en büyük problemlerden biri sperm hareketliliğinin kısıtlı olması veya hiç olmamasıdır. Bazı vakalarda hareketliliğin zamana koşut azalması da söz konusu olabilmektedir. Bugüne kadar sperm hareketliliğini artıran çeşitli farmakolojik ajanlar tanımlanmış olsa da bunlardan yalnız pentoksifilin geniş kullanım alanı bulmuştur. Pentoksifilin hücre içi cAMP konsantrasyonunu artırarak işlev görür. Ancak cAMP artışının oosit matürasyonu üzerine olumsuz etkileri de bilindiğinden, pentoksifilin uygulanan sperm hücrelerinin en çok 30 dakika inkübasyonun ardından kültür sıvısıyla yıkılarak kullanılması tavsiye edilir. Pentoksifilin ve benzeri ajanların IUI uygulamalarında kadın üreme sistemine verilmesinin güvenilirliğini ortaya koyan çalışmalara ihtiyaç vardır.

■ HYALURONİK ASİTE BAĞLANMA KAPASİTESİNE GÖRE SEÇİM

Sperm seçiminde kullanılan ölçütlerden biri de sperm plazma membranında yer alan hyaluronik asit (HA) bağlanma bölgelerinin ifadesidir.²¹ HA'ya bağlanma kapasitesi spermle matürasyonu hakkında bilgi vermektedir. Üzerinde 4 adet HA bölgesi barındıran ve bu yöntemle özel olarak üretilen kültür kapları (PICSİ, (PICSİ; Origio, Malov, Danimarka) ticari olarak satışıdır. Sperm hücreleri HA içeren bölgenin diğer ucuna doğru çizilen düşük hacimli kültür sıvısı kanalları boyunca yüzer ve 15 dakikalık inkübasyonun sonunda HA'ya bağlanan spermle ICSI pipetiyle toplanır.²² Bu spermle ait kreatin kinaz, HspA2 (heat shock-related protein 2) ve anilin mavisi boyamaları, bu yöntemle olgun spermle seçildiğini doğrulamaktadır. Literatürde HA-bağlanma kapasitesine sahip spermatozoonların canlılık ve hareketlilik oranları yüksek, akrozom reaksiyonuna girmemiş ve kaspaz-3 aktivasyonu düşük özellikte olduğunu gösteren çalışmalar vardır.^{23,24} Ayrıca HA-bağlanma kapasitesine göre seçilen spermle DGS ve yalnız yıkama yöntemleriyle muamele edilen spermle karşılaştırıldığında DNA fragmentasyonunun azaldığı gösterilmiştir.²⁵ Bu bulgular ışığında; HA-bağlanma

testi kaliteli sperm seçiminde gerek rutin, gerekse ileri sperm seçim yöntemlerinin önüne geçmektedir. Ayrıca, HA'nın servikal mukus, kumulus hücreleri ve folikül sıvısının doğal bir bileşeni olması nedeniyle toksisite riski düşüktür. Buna karşın yayınlanan az sayıda klinik çalışmada fertilizasyon ve gebelik oranları açısından bir fark yaratmamış olması yöntemin yaygın kullanımını kısıtlamıştır.

MANYETİK HÜCRE AYRIŞTIRMA (MAGNETIC ACTIVATED CELL SORTING; MACS)

MACS yöntemi başlangıçta somatik hücreler için geliştirilen ve çok çeşitli protein belirteçlerine uyarlanabilen ileri bir tekniktir. Günümüzde MACS tekniğiyle (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Almanya) apoptotik olmayan spermatozoonların seçilmesi mümkündür. Yöntem Annexin-V antikorunun programlı hücre ölümünün erken belirteçlerinden olan ve hücre zarının dış yüzüne göç etmiş fosfatidilserin (phosphothidilserine; PS) moleküllerine afinitesini temel alır.²⁶ Yıkama işleminin ardından sperm hücreleri Annexin-V bağlı manyetik mikrokürelerin bulunduğu bir süspansiyonda, oda ısısında, 15 dakika süreyle inkübe edilir. İnkübasyonun ardından mikroküre-hücre karışımı metal bir plakaya sabitlenen manyetik özellikli kolondan geçirilir. Annexin-V bağlı mikrokürelerin PS moleküllerine yapıştığı apoptotik spermler manyetik özellikli kolon içerisinde kalırken, apoptotik olmayan spermler yere dik konumlanan kolondan aşağı akar. Manyetik mikroküreler biyo-çözünürdür ve hücre canlılığını etkilemez, ancak bir sperm seçim yöntemi olarak değerlendirildiğinde, apoptotik olmayan sperm süspansiyonunda serbest dolaşan manyetik mikrokürelerin bulanabileceği göz önünde bulundurulmalı ve rutin uygulamalarda embriyotoksisite riski dikkatle değerlendirilmelidir. Literatürde apoptozun geç evrelerinde ortaya çıkan DNA kırıklarının yüksek oranda (>%30) olduğu hasta gruplarında düşük fertilizasyon ve gebelik oranları bildirilmiştir. 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada tekrarlayan IVF başarısızlığı öyküsü olan, apoptozun önemli belirteçlerinden DNA kırığı oranlarının %30 ve üzerinde olduğu normozoospermik hastalarda ejakülat yerine testiküler sperm aspirasyonundan (TESA)

elde edilen sperm hücreleri kullanılmış ve gebelik oranlarının anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.²⁷ MACS uygulaması öncesi ve sonrasında DNA kırığı oranlarının ölçüldüğü çalışmalar da bu yöntemin apoptotik sperm hücrelerinin eliminasyonunda başarılı olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak MACS uygulamasını takiben sayı ve hareketlilikte izlenen düşüş yöntemin dezavantajlarından biri olmaya devam etmektedir.²⁸ Ayrıca, yöntemin lökositlerin ve immatür germ hücrelerinin eliminasyonunu sağlayamaması nedeniyle klinik uygulamalarda dansite-gradyent yöntemiyle birlikte uygulanması önerilmektedir.²⁹ Dansite-gradyent yönteminin ardından MACS uygulanan kontrollü randomize bir çalışmada fertilizasyon oranlarında anlamlı bir artış izlenmemekle birlikte, gebelik oranlarının istatistiksel anlamlı olarak arttığı (kontrol ve deney gruplarında sırasıyla; %48 ve %37) bildirilmiştir.³⁰ Ancak bununla beraber MACS'ın SU ve DGS ile kombine edilmesinin sperm kalitesine anlamlı ölçüde bir fayda sağlamadığı, aksine ileri hareketli sperm sayısında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Bu açıdan rutin sperm hazırlığında kullanımı kısıtlıdır.³¹ Apoptotik sperm hücrelerinin seçilerek uzaklaştırıldığı bir başka yöntem de **cam yününden filtrasyon** tekniğidir. Bu sistem, hazır olarak satın alınabilen cam-yün ayırma kolonlarının (SpermFertil, TranMIT, GmbH, Giessen, Almanya) iç yüzeyi Annexin-V molekülleriyle kaplanarak, apoptotik sperm hücrelerini ayrıştırarak şekilde geliştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. Yöntemin hem taze, hem dondurma-çözme sonrası örneklerde uygunluğu test edilmişse de, standardizasyon için gerekli çalışma sayısına ulaşamamıştır.

MİKROAKIŞKAN SİSTEMLER

Spermlerin belli bir akışkan sistem içinde, mikrokanaallar boyunca, gradyente karşı hareket ederek seçilmesini sağlayan sistemlerdir. Oldukça yeni bir yöntem olmasına rağmen yaygın bir kullanıcı talebi görmüştür. Shirota ve ark. bu sistemler kullanıldığında sperm DNA fragmentasyonunun, SU ve DGS'ye göre daha başarılı şekilde elimine edilebildiğini göstermişlerdir, ancak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.³²

DNA özelliklerinin ve protein düzeylerinin dikkate alındığı sperm seçim yöntemlerinin geliştirilmesi ÜYT’de özellikle erkek infertilitesinde başarı oranlarının artırılması açısından büyük önem arz etmektedir. Bu çerçevede son yıllarda sıkça tartışılan oksidatif stres parametrelerinin yeni tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir aday olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stresin en önemli belirteçlerinden ROS’un kemiluminisens problemlarla tespiti henüz yalnız bir teşhis yöntemi olarak kullanılsa da, son yıllarda yapılan çalışmalar ROS dü-

zeylerinin fertilizasyon ve embriyo gelişiminde rol alan önemli moleküllerle lineer ilişkilerini ortaya koymaktadır. ÜYT’de yeni sperm seçme metodları değerlendirilirken, temel seçme yöntemleri olan SU ve DGS’ye ve bunların kombine kullanımına alternatif olabilecek nitelikte, sperm kalitesinde bir iyileşme sağlanıp sağlanmadığı göz önünde bulundurulmalıdır. Merkezler her zaman kendi laboratuvar şartlarına uygun, en az karmaşık olan ve en iyi sonucu veren yöntemi adapte etmeye gayret etmelidir.

KAYNAKLAR

1. Organization, WH, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Vol. Fifth edition. 2010.
2. Li Z., et al., Effects of semen processing on the generation of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential of human spermatozoa. *Andrologia* 2012; 44(3):157-63.
3. Matsuura R, Takeuchi T, and Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J Androl* 2010;12(5):753-9.
4. Xue X., et al. 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): 1161-6.
5. Paasch U, Grunewald S, and Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:515-25.
6. Overstreet JW, et al. In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertil Steril* 1980; 34(6):604-6.
7. Jindal SK, et al. Guidelines for risk reduction when handling gametes from infectious patients seeking assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 2016;33(2): 121-30.
8. Le Lannou D, and Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 1988;84(2):551-6.
9. Rappa KL, et al. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnol Adv* 2016;34(5): 578-87.
10. Shekarriz M, et al. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol* 1995;28(1):31-5.
11. Kıratlı S. Migrasyon sedimentasyon yönteminin semen hazırlamadaki etkinliğinin santrifügasyon kullanılan yöntemle karşılaştırılarak değerlendirilmesi, in *Histoloji ve Embriyoloji*. Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi; 2016. p.73.
12. Amiri I, Ghorbani M, and Heshmati S. Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *J Clin Diagn Res* 2012;6(9):1451-3.
13. Luppi S, et al. Comparative proteomic analysis of spermatozoa isolated by swim-up or density gradient centrifugation. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:36.
14. Highland HN, et al. Ficoll-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques. *J Hum Reprod Sci* 2016;9(3): 194-9.
15. Ahmad L, et al., Sperm preparation: DNA damage by comet assay in normo- and teratozoospermics. *Arch Androl* 2007;53(6): 325-38.
16. Jayaraman V, et al. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(6):557-63.
17. Borges E, Jr, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcomes: the role of sperm preparation techniques. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(6):849-54.
18. Ricci G, et al. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril* 2009;91(2):632-8.
19. Ozkavukcu S, et al. A laboratory modification to testicular sperm preparation technique improves spermatogenic cell yield. *Asian J Androl* 2014;16(6):852-7.
20. Celik-Ozenci C, Sati L, and Celik S. Effect of erythrocyte-sperm separation medium treatment on sperm motility, viability, morphology, acrosome reaction, hyaluronic acid binding, chromatin condensation, and DNA fragmentation. *Fertil Steril* 100(3):S449-S450.
21. Huszar G, et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14(5):650-63.
22. Jakab A, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84(6):1665-73.
23. Huszar G, et al. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18(3):260-7.
24. Yagci A, et al. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl* 2010; 31(6):566-72.
25. Tarozzi N, et al. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* 2009;19 Suppl 3:35-43.
26. Grunewald S, Paasch U, and Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2(3):127-33.

27. Pabuccu EG, et al. Testicular versus ejaculated spermatozoa in ICSI cycles of normozoospermic men with high sperm DNA fragmentation and previous ART failures. *Andrologia* 2016.
28. Said TM, et al. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;29(2):134-42.
29. Said T, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006;74(3):530-7.
30. Dirican EK, 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(8):375-81.
31. Cakar Z, et al. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2016;33(8):1059-65.
32. Shirota K, et al. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil Steril* 105(2):315-21.e1.