

Sperm DNA fragmentasyonu, hiperaktivasyonu ve hyalüronan bağlama yeteneği in vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda fertilizasyon ve embriyo gelişimi için tahmin ettirici faktörler midir?

Pregl Breznik B, Kovacić B, Vlasisavljevic V.
Fertil Steril. 2013 Apr; 99(5): 1233-41.

Konvansiyonel *in vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemiyle karşılaştırıldığında intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) özellikle kötü semen örnekleri olan hastalarda daha yüksek bir fertilizasyon oranı sağlar. Ayrıca ICSI total fertilizasyon başarısızlığından (TFF) korur. Buna rağmen ICSI, konvansiyonel IVF'den daha invaziv bir inseminasyon yöntemidir ve spermatozoanın doğal seleksiyonunu atlar. Çoğu infertilite kliniğinde oosit inseminasyonunda IVF yönteminin mi ICSI yönteminin mi kullanılacağına karar spermatozoa konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisinin göz önünde bulundurulduğu klasik semen analizine dayanır. Buna rağmen bu değerlendirmenin tanısallık duyarlılığı düşüktür ve sadece bu üç parametrenin değerlendirilmesiyle sıklıkla infertilitede erkek faktörü taranamamış olur. İspatlanmış erkek kaynaklı infertilitenin olduğu erkeklerin yaklaşık %15'inin spermiyogramları normaldir. Spermatozoanın fonksiyonelliğini değerlendirmek için çeşitli ilave laboratuvar testleri geliştirilmiştir. Bunların arasında sadece hyaluronan bağlama yeteneği (HBA), sperm DNA fragmentasyonu (Halosperm) ve spermatozoa hiperaktivasyonu testleri basit ve aynı semen örneğinin oosit inseminasyonu için kullanılabileceği şekilde yeterince hızlıdır.

Bu çalışmanın amacı bahsedilen sperm fonksiyon testlerinin konvansiyonel IVF ve ICSI'da sperm fertilizasyon yeteneğinin öngörülmesinde, tanısallık değerinin değerlendirilmesidir.

Bu amaçla, IVF-ICSI ile ilk ya da ikinci kez infertilite tedavisi olan 133 çift çalışmaya dahil edilmiştir. Kadınlar 37 yaşının altında olup hiçbirinde endometriosis, polikistik over veya polikistik over sendromu yoktu. Daha önce hafif erkek faktörlü infertilitesi olan (doğal ejakulattaki sperm konsantrasyonunun 5×10^6 /ml'den yüksek 15×10^6 /ml'den düşük olduğu ve motil sperm oranının %25'den yüksek %40'dan düşük olduğu) çiftler çalışmaya dahil edildi. Stimülasyon protokolü GnRH agonist/GnRH antagonist ve rekombinan folikül stimulan hormon/human menopozal

gonadotropin kombinasyonu şeklindeydi. Ortalama folikül çapı 18 mm'nin üstünde olan hastalara hCG uygulandı. hCG enjeksiyonundan 35-36 saat sonra foliküler puncture ve oosit toplanması işlemi uygulandı. Sperm motilitesi doğal ve yıkanmış semen örneklerinde Sperm Class Analyzer ile SCA 5.0 software versiyon kullanılarak değerlendirildi. Doğal semenden sperm morfolojisi Tygerberg's strict kriterleriyle değerlendirildi ve kesitler Papanicolaou tekniğiyle boyandı. Yıkanmış spermelerin morfolojik özellikleri Cell-vu prestained kesitleriyle değerlendirildi. Motil sperm koloidal dansite gradiyenti kullanılarak %80'in 2 ml'si ve %40'ın 2 ml'si tabakalarıyla seçildi. Semen volümü gradiyentin üst tabakasına eklendi ve tüpler 20 dakika 600 xg de santrifüje edildi. Supernatan ayrıldı ve pellet 3ml sperm hazırlama ortamıyla tekrar suspanse edildi ve 600 xg de 10 dakika santrifüj yapıldı. Supernatan tekrar uzaklaştırıldı ve pellet 0.5 ml taze medyuma yerleştirildi (37 C ve 30 dakika). Üst tabaka ayrıldı ve hazırlana semen örneği IVF ve ICSI metotlarında oosit inseminasyonu için veileri analizler için kullanıldı. DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi Halosperm kit kullanılarak yapıldı. Düşük erime noktalı agarozun Epandorf tüpteki jelleşmiş sıvı kısmı 4 dk mikrodalgada bekletildi, sonra 37 C su banyosuna alındı. 5 dk inkübasyondan sonra semen örneğinin 25 ml'si Epandorf tüpe eklendi ve agarozla karıştırıldı. Bu karışımın 25 µL'si kesitlerin üzerine pipetle verildi ve 22x22 mm lamelle kaplandı. Kesitler 4 C soğuk plaklara 5 dk yerleştirildi. Lamel kaldırılıp asit solüsyonda 7 dk bekletildi. Kesitler 25 dk 10 ml lizin solüsyonuna daldırıldı. Distile suyla 5 dk boyunca yıkandıktan sonra etanol artan konsantrasyonlarında dehidrate edildi, havada kurutuldu ve opak kapalı kutularda oda sıcaklığında saklandı. Parlak alan mikroskopisi için kesitler Wright boyama solüsyonu ve fosfat tampon solüsyonu karışımıyla kaplandı (20-25 dk). Daha sonra kesitler suyla yıkandı ve kurutuldu. Mikroskopun 200 objektifinde her örnekte en az 500 sperm skor-

landı. Çok küçük halkalı, halkasız spermier degrade sperm hücreleri gibi fragmant DNA içeriyor olarak değeriendi. Hiperaktivasyon analizi, SCA kullanılarak yapıldı. SCA ile aşığıdaki hareket parametreleri ölçüldü ve istatistiksel analizde kullanıldı. Lateral baş yerleşim bozukluğu (ALH), çapraz çarpma sıklığı (BCF), kurvilineer hız (VCL), düz hat hızı (VSL), ortalama yol hızı (VAP), doğrusallık (LIN). Hiperaktif spermatozoa şu parametrelerle tanımlanmıştır: ALH $\geq 5\mu\text{m}$, LIN $\leq \%60$, VCL $\geq 100\mu\text{m/s}$. Yıkanmış semende-ki spontan ve indüklenmiş hiperaktif sperm yüzdesi hesaplandı. Hiperaktivasyon HAmox reagent ile indüklendi. Hyaluronan bağlama yeteneğı olan sperm yüzdesi şöyle belirlendi: 10 μl semen HBA çemberine eklendi. Cell-Vu ızgara lamel eklendi. 15 dakika inkübasyon sonrası bağlanmamış ve bağlanmış hareketli spermier sayıldı. Aynı karedeki enaz 200 sperm yada 100 kare sayıldı. Motil hareketli spermin toplam bağlanmış ve bağlanmamış hareketli sperm sayısına bölünmesiyle yüzde elde edilmiştir.

IVF sikluslarında fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesi ile sperm DNA fragmantasyonu arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Fertilizasyon oranı ile hyaluronan bağlama yeteneğı veya indüklenmiş hiperaktivite arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Düşük fertilizasyon oranlı IVF

sikluslarındaki semen örnekleri (grup 1) yüksek fertilizasyon seviyesi olan grupla (grup 2) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak belirgin yüksek sperm DNA fragmantasyonu ve düşük hyaluronan bağlama yeteneğı ile karakterize bulunmuştur. ICSI sikluslarında sperm fonksiyon testleriyle fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesi arasında ilişki bulunamamıştır. Halosperm test, HBA test ve indüklenmiş hiperaktivite IVF'de oosit fertilizasyonunda sperm yeteneğinin öngörülmesinde kullanışlıdır ve IVF ve ICSI için uygun semen örneklerinin belirlenmesinde yardımcıdır.

Sonuç olarak her üç fonksiyon testi, konvansiyonel IVF sonrası fertilizasyon oranı tahmin etmek için yararlı araçlardır. Bu testler, sperm fonksiyonallitesinin analizi için oldukça basit ve güvenilir yöntemlerdir. Ayrıca, tüm üç fonksiyon testin sonuçları 2 saatten kısa süre içinde elde edilebilir. Bu testler IVF için semen analizinin rutin bir parçası olabilir. Çünkü oosit inseminasyonu için IVF ya da ICSI kararı verilmesi aşamasında yardımcı olacaklardır. Halosperm testi, embriyo gelişimi sonuçlarının öngörülmesinde yararlıdır.

Çeviri

Dr. Erkan Efe, Prof. Dr. Sefa Resim

Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji AD