

GİRİŞ

İNTRAUTERİN INSEMİNASYON (IUI)

- Yardımla üremede Sperm'in Mikroskopik İncelenmesi
- Sperm Morfolojisinin Değerlendirmesi
- Normal Spermin Morfolojik Özellikleri
- Sperm Hareketliliği ve Motilitenin Değerlendirilmesi
- Sperm hazırlama teknikleri:
- (Swim up) Yukarı Yüzdürme Tekniği
- Dansite Gradient (yoğunluk sıralayıcısı) Tekniği

İN VİTRO FERTİLİZASYON

IVF uygulaması için beş temel adım vardır:

- 1.Adım : Stimülasyon
- 2.adım: Oosit toplama
Mikroenjeksiyon Öncesi oositlerin Hazırlanması (Denüstasyon İşlemi)
- 3.adım: Fertilizasyon
İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)

Pronukleus Değerlendirmesi

- 4.adım: Erken ve İleri Dönem Embriyo Gelişimi
- Bölünme Evresi Sınıflaması
- Erken Bölünme ve bölünme süreci
- İleri Dönem Embriyo Gelişimi
- Blastokist Dönemi Sınıflaması
- Dinamik embriyo izleme sistemi (DEIS), embriyoskop takibi
- 5. Adım; Embriyo Transferi
- IVF UYGULAMALARINDA İLERİ SPERM TESTLERİ
- Sperm kromatini ve kromatin kondansasyonu
- Anilin mavisi (anilin blue) testi
- Sperm DNA hasarları
- Nükleusta DNA Hasarı
- Apoptoz
- Oksidatif Stres

KAYNAKLAR

GİRİŞ

Üremeye yardımcı teknikler ovulasyon kusurları ve sperm morfoloji ve fizyolojisindeki problemler nedeni ile infertil kalan bireylerin problemlerini çözme amacı ile geliştirilmiştir. Tedavide birinci basamak spermelerin hazırlandıktan sonra uterusa enjeksiyonu ile gerçekleştirilmektedir. İntrauterin inseminasyon diye tanımlanan bu işlem sonuç vermediği durumda in vitro fertilizasyona yönelinmektedir. 2000'li yıllara kadar uygulama in vitro fertilizasyon şeklinde (IVF), daha sonraları da sitoplazma içine sperm enjeksiyonu yapılarak (ICSI) embriyo elde etme amaçlanmaktadır.

İNTRAUTERİN INSEMİNASYON (IUI)

İntrauterin inseminasyon spermelerin özel kültür sıvılarında semenden ayrılarak hazırlanıp uterusa enjekte edilmesidir. Bu işlem genel olarak sperm konsantrasyonunun 5 milyon/ml üzerinde bulunduğu durumlarda uygulanmaktadır. Sperm hazırlama ve seçimi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Yardımla üremede Sperm'in Mikroskopik İncelenmesi:

Mikroskopik değerlendirme sonucunda spermiyogram Dünya sağlık örgütü (WHO) kurallarına göre yorumlanır (tablo 1).

¹ İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ejakülat örneğindeki bu anomalilerin nedenleri: spermatozoon olgunlaşması esnasındaki hatalı paketlenme, apoptozun neden olduğu DNA fragmantasyonu ve oksidatif strestir.

Apoptoz

Normal fizyolojik ortamın devamlılığının sağlanmasında, doku canlılığında ve enfekte hücrelerin yok edilmesinde etkili olan apoptoz, testiküler dokuda da saptanan bir süreçtir. Spermatogenez esnasında, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ek olarak germ hücre ölümü de gözlemlenir ve bu olay sperm oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Apoptoz, spermatogenez esnasında programlı hücre ölümüne neden olur ve bu durum spermatozoonun normal gelişimi için gereklidir. Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste sürekli olarak apoptoz olayının gerçekleştiği ortaya konmuştur. Germ hücrelerinin %75'i testiste apoptoza maruz kalır. Apoptoz sürecindeki hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleriyle sertoli hücreleri arasında sayısal olarak uygun oranı sağlamaya yönelik fizyolojik yanıt olarak tanımlanmıştır. Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hasta gruplarında, deneysel kriptorşitizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışı olduğu durumlarda testislerde programlı hücre ölümlerinde artma olabilir. Spermatogenez sürecinde apoptozun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir. Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere maruz kalması da germ hücrelerindeki apoptozu arttıran bir diğer faktördür. Sonuç olarak, testiküler fizyolojiyi bozan dış faktörlerin varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve bu durum klinik açıdan spermatogenezde bozulma ve infertiliteye neden olabilir.

Oksidatif Stres

Yaşayan tüm aerobik hücreler gibi spermatozoada da hayatın devamı için oksijen gereklidir fakat oksijenin yıkım ürünü olan reaktif oksijen türevleri düzeyinde artış meydana gelirse, hücre işlevi ve yaşamı için zararlı etkiler oluşturabilecek

oksidatif stres oluşur. Oksijen ve oksijen kaynaklı oksidanlar, hücresel hasar oranlarının artmasına sebep olur. İnfertil erkeklerin büyük bir kısmında ROS düzeylerinin yüksek seviyelerde olduğu ve oksidatif stresin önemli bir infertilite sebebi olduğu gösterilmiştir. Reaktif oksijen türlerine bağlı olarak, DNA zincirinin kırılması, kromozom yapısında delesyon, kromatin yapısının çapraz bağlanması, DNA baz oksidasyonu gibi çeşitli sperm DNA hasarı formları ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca ROS, apoptoz mekanizmasında aracılık eden sitokrom c ve kaspaz 3-9'u uyarak, tek ve çift iplikçikli DNA zincir kırıklarının büyük oranlarda artmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle, seminal oksidatif stres, sperm DNA hasarı ve apoptoz birbirleriyle, erkek infertilitesi açısından önem arz eden, patojenik moleküler mekanizmayı oluşturmaktadırlar. İnfertilite, oksidatif stres, sperm DNA hasarı ve apoptoz düzeyi yüksek olan hastalarda ortaya çıkan ana komplikasyondur. Fakat bu değişkenlere sperm kalitesinden bağımsız olarak da dikkat edilmesi gerekmektedir. Bundan dolayı patojenik ROS seviyeleri veya düşük kalitedeki sperm kromatin yapısı, erkek subfertilitesinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Erkek infertilitesi üzerine bu faktörlerin etkisi her zaman tartışma konusu olmuştur.

KAYNAKLAR

- WHO Manual for the examination and processing of human semen, 5th edn. Geneva 2010, Cambridge University press
- Kruger T.F., Franken D.R. Atlas of human sperm morphology Taylor & Francis, 2004
- Hoogendijk CF, Kruger TF, Bouic PJ, Henkel RR. A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril.* 2009;91(4):1285-92.
- Orhon. E. (1996): Sperm morfoloji atlası. Ed. Esat Orhon. Türkiye Infertilite Vakfı Yayınları No:4.
- WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical mucus interaction 1999, Cambridge University press
- Fleming S.D., Meniru G.I., Hall J.A., Fishel S.B.: Semen analysis and sperm preparation. In Handbook of intrauterine insemination. Cambridge University press (1997)
- Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D. (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59:1037-1046

- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş (Çeviri Editörü: Ramazan Demir). 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık Tic. Ltd. Şti. 2006: 531- 64.
- Edwards R.G., Brody S.A. Human fertilization in the laboratory. In: principles and practice of assisted human reproduction. Saunders, Philadelphia, PA, pp. 351-413
- İrez T. (çeviri ED.) In vitro fertilizasyon. Kay Elder ve Brian Dale Nobel Tıp Kitapevi 2014, 50-63
- O'Neill CL, Chow S, Rosenwaks Z, Palermo GD. Development of ICSI. *Reproduction*. 2018 Apr 10. pii: REP-18-0011. doi: 10.1530/REP-18-0011.
- İrez T., Arda O., Kaleli S. (çeviri Ed) Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı Nobel Tıp Kitapevi 2010, 65-162
- Palermo GD, Neri QV, Monahan D, Kocent J, Rosenwaks Z. Development and current applications of assisted fertilization. *Fertil Steril*. 2012 Feb;97(2):248-59. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.037. Review
- Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development *Reprod Biomed Online*. 2003 Mar;6(2):201-14.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2004 Mar;19(3):611-5. Epub 2004 Jan 29.
- Meriano J.S., Clark C., Kadesky K., Laskin C.A. Binucleated and multinucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *RBMonline* 9(5):511-520
- Zebitay, A. G.; İrez, T.; Usta, T. A., Karahuseyinoglu S., Oral E., Sahmay S., Cetin O. Is early embryo cleavage a factor to increase success in all types of ICSI indications? *CLINICAL AND EXPERIMENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY* 2017, Volume: 44 Issue: 3 Pages: 353-358
- The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology*. *Hum Reprod*. 2011 Jun;26(6):1270-83. doi: 10.1093/humrep/der037. Epub 2011 Apr 18
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008 Sep;17(3):385-91.
- Pribenszky C, Mátyás S, Kovács P, Losonczi E, Zádori J, Vajta G. pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online*. 2010 Oct;21(4):533-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.015. Epub 2010 Apr 24
- Zaninovic N, Irani M, Meseguer M. Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy? *Fertil Steril*. 2017 Nov;108(5):722-729. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.10.002. Review. Erratum in: *Fertil Steril*. 2017 Dec 12;:
- Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update*. 2015 Nov-Dec;21(6):727-47. doi: 10.1093/humupd/dmu064. Epub 2015 Jan 6. Review
- Hur YS, Ryu EK, Hyun CS, Yang SH, Yoon SH, Lim KS, Lee WD, Lim JH. Retrospective study of single vitrified-warmed blastocyst transfer cycles according to the presence of morphokinetic variables. *Clin Exp Reprod Med*. 2018 Mar;45(1):52-55. doi: 10.5653/cerm.2018.45.1.52. Epub 2018 Mar 30
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011 Oct;26(10):2658-71. doi: 10.1093/humrep/der256. Epub 2011 Aug 9
- Del Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambilla F, Comi R, Fadini R. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2012 Nov;25(5):474-80. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.07.016. Epub 2012 Aug 2
- Desai N, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertil Steril*. 2018 Apr;109(4):665-674. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.025. Epub 2018 Feb 13
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online*. 2013 Aug;27(2):140-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.04.013. Epub 2013 May
- Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*, 2006; 175: 495- 9.
- Ward WS, Coffey DS. DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. *Biol Reprod*, 1991; 44: 569- 74.
- Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: Unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev*, 2001; 58: 357- 8.
- Ward WS, Coffey DS. DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. *Biol Reprod*, 1991; 44: 569- 74.
- Oliva R. Protamines and Male Infertility. *Human Reproduction Update*, 2006; 12: 417 – 35.
- Zhang X, San Gabriel M, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous sub-populations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl*, 2006; 27: 414- 20.
- Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA damage resulting from various sperm treatments persists after fertilization and is similar before and after DNA replication. *J Androl* 2012;33(2):229-38.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000;45(3):215-25.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Lu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005;26(6):741-8.
- Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986;105:1-65
- Gill-Sharma MK, Choudhuri J, D'Souza S. Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. *Protein Pept Lett*. 2011 Aug;18(8):786-801.

- Miller D, Paradowska A. Evaluating the localization and DNA binding complexity of histones in mature sperm. *Methods Mol Biol.* 2013;927:459-75
- Bogliotti YS, Ross PJ. Mechanisms of histone H3 lysine 27 trimethylation remodeling during early mammalian development. *Epigenetics.* 2012 Sep;7(9):976-81. Epub 2012 Aug 16.
- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):29471-7. Epub 2003 May
- Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet.* 2009 Nov-Dec;26(11-12):591-6. doi: 10.1007/s10815-009-9361-3. Epub 2009 Nov 6.
- Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, Emery B, Carrell DT. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod.* 2014 May;29(5):904-17. doi: 10.1093/humrep/deu040. Epub 2014 Mar 10
- Xie D, Lu C, Zhu Y, Zhu S, Yang EJ, Jin X. Analysis on the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility. *Exp Ther Med.* 2018 Jun;15(6):5173-5176. doi: 10.3892/etm.2018.6115. Epub 2018 May 2
- Pourmasumi S, Sabeti P, Rahiminia T, Mangoli E, Tabibnejad N, Talebi AR. The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2017 Jun;15(6):331-344. Review
- Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S Apoptosis, spermatogenesis and male infertility *Front Biosci (Elite Ed).* 2012 Jan 1;4:746-54.
- Martincic DS1, Virant Klun I, Zorn B, Vrtovec HM Germ cell apoptosis in the human testis. *Pflugers Arch.* 2001;442(6 Suppl 1):R159-60.
- Kerr GE, Young JC, Horvay K, Abud HE, Loveland KL Regulated Wnt/beta-catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice. *Biol Reprod.* 2014 Jan 9;90(1):3. doi: 10.1095/biolreprod.112.105809. Print 2014 Jan.
- Kidder GM, Cyr DG. Roles of connexins in testis development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Feb;50:22-30. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.12.019. Epub 2016 Jan 11. Review
- Luke Simon, Armand Zini, Alina Dyachenko, Antonio Ciampi, and Douglas T Carrell A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome *Asian J Androl.* 2017 Jan-Feb; 19(1): 80–90. Published online 2016 Jun 24. doi: 10.4103/1008-682X.182822 PMID: PMC5227680 PMID: 27345006
- Manku G, Culty M. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction.* 2015 Mar;149(3):R139-57. doi: 10.1530/REP-14-0431. Review
- Matsushita K, Miyake H, Chiba K, Fujisawa M. Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in the rat testis. *Andrologia.* 2016 Feb;48(1):11-9. doi: 10.1111/and.12404. Epub 2015 Feb 7
- Kaur S, Saluja M, Bansal MP. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia.* 2018 Apr;50(3). doi: 10.1111/and.12834. Epub 2017 Jul 18
- Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res.* 2009 Apr;129(4):357-67. Review
- Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SE. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online.* 2013 Jan; 26(1):68-78. Epub 2012 Oct 4.
- Palermo GD, Neri QV, Monahan D, Kocent J, Rosenwaks Z. Development and current applications of assisted fertilization. *Fertil Steril.* 2012 Feb;97(2):248-59. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.037. Review
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004 Mar;19(3):611-5. Epub 2004 Jan 29.
- Pregl Breznik B, Kovačić B, Vlaisavljević V. Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril.* 2013 Apr; 99(5):1233-41. Epub 2013 Jan 3.
- Hachemi M, Bensaada M, Rouabah A, Zoghmar A, Benbouhedja S, Rouabah L, Benchaib M. Effect of Spermatocytic Nuclear Quality on Live Birth Rates in Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Hum Reprod Sci.* 2019 Apr-Jun; 12(2):122-129.