

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PICSI DISHI İLE SEÇİLEN SPERM İLE ELDE EDİLEN
EMBRİYOLARIN KALİTESİ VE BUNUN GEBELİK ORANI
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan
Esin SİDAR YALÇINOĞLU**

**Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Şubat 2012
KAYSERİ**

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PICSI DISHI İLE SEÇİLEN SPERM İLE ELDE EDİLEN
EMBRİYOLARIN KALİTESİ VE BUNUN GEBELİK ORANI
ÜZERİNE ETKİSİ

Hazırlayan
Esin SİDAR YALÇINOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN

Yüksek Lisans Tezi

Şubat 2012
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

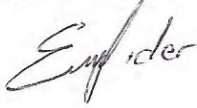
Adı-Soyadı: Esin SİDAR YALÇINOĞLU

İmza : *Esin Sıdar*

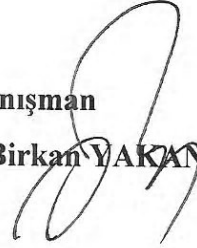
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“PICSİ Dishı ile Seçilen Sperm ile Elde Edilen Embriyoların Kalitesi ve Bunun Gebelik Oranı Üzerine Etkisi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

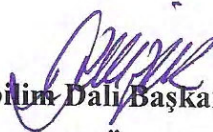
Tezi Hazırlayan
Esin SİDAR YALÇINOĞLU



Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR



Prof. Dr. Birkan YAKAN danışmanlığında **Esin SİDAR YALÇINOĞLU** tarafından hazırlanan “**PICSI Dishi ile Seçilen Sperm ile Elde Edilen Embriyoların Kalitesi ve Bunun Gebelik Oranı Üzerine Etkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji-Embriyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

21/02/2012

JÜRİ

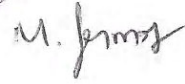
Danışman : Prof. Dr. Birkan YAKAN (Histoloji-Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR (Histoloji-Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Ercan M. AYGEN (Kadın Hast.ve Doğum AD)

Üye : Doç.Dr.M.Fatih SÖNMEZ (Histoloji-Embriyoloji AD)

İmza

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde bilgi, deneyim ve yardımlarıyla beni yönlendiren, sabır ve desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi tez danışmanım Prof. Dr. Birkan YAKAN'a

Yakın ilgi, yardım ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri sayın Prof. Dr. Ercan AYGEN ve Prof. Dr. Yılmaz ŞAHİN'e

Uyumlu bir çalışma ortamı sağlayıp, manevi desteklerini her zaman hissettiğim Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim Üyeleri sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve Doç. Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ'e

Çalışmanın her aşamasında manevi desteklerini ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen Uz. Embriyolog Betül ÖZDEMİR ve Tüp Bebek Ünitesi çalışma arkadaşlarıma,

Sevgi ve desteğiyle hayatımın her aşamasında her zaman yanımda olan eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

PICSI DISHI İLE SEÇİLEN SPERM İLE ELDE EDİLEN EMBRİYOLARIN KALİTESİ VE BUNUN GEBELİK ORANI ÜZERİNE ETKİSİ

Esin SİDAR YALÇINOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2012

Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN

KISA ÖZET

IVF’ de en önemli işlemlerden birisi transfer için en iyi kalitedeki embriyoların seçimidir. Geleneksel olarak tüp bebek merkezlerinde, çeşitli klivaj safhasındaki embriyolar morfolojik özelliklerine göre değerlendirilerek seçilmektedir. Fakat embriyo morfolojisinin, implantasyon potansiyeli ve gebelik oranları hakkında bilgi verip vermediği kesin değildir.

İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) teknolojik ilerleme ile bir yumurtaya tek bir sperm etkin bir şekilde enjekte edilmesi için kullanılır.PICSI dishi ICSI uygulamasında olgun sperm seçimi için kullanılan bir yöntemdir.PICSI dishi hyaluronan (HA) eklenmiş steril plastik kültür dishi’dir.PICSI ile seçilen HA-bağlı spermelerde aneuploidi oranının düşük olduğu savunulmakla birlikte bu yöntem ile daha iyi kalitede embriyo gelişimi ve gebelik oranları üzerinde olumlu etkisi olduğu düşünülmektedir

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesinde infertilite sebebi açıklanamayan 25-35 yaş arası kadın ile normozoo (20 milyon ve üstü) sperme sahip erkeklerden oluşmaktadır.50 çiftten oluşan bu çalışmada 24 hastaya embriyolog tarafından görsel olarak seçilmiş sperm ile ICSI yapılmış ,diger 26 hastaya PISCI dishinde HA içeren bölgeye yapışan HA-bağlı sperm ile ICSI yapılmıştır.Bu iki grup embriyo gelişimi ve gebelik oranları bakımından kıyaslandı.

Çalışmamızda embriyo gelişimleri benzer olduğu,gebelik oranlarının ICSI’de %37.5 PICSI’de ise %42 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, HA bağlı spermle yapılan ICSI ile sonrasında gelişen embriyolarn daha iyi kalitede olduğu ve gebelik oranlarını artıracığı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: ICSI,PICSI,İnsan spermi, HA-bağlı,embriyo morfolojisi

**THE QUALITY OF THE EMBRYOS OBTAINED WITH SPERM SELECTED
THROUGH DISHI AND ITS EFFECT ON PREGNANCY RATE**

Esin SIDAR YALCINOGLU

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Histology and Embryology Department

Thesis of Postgraduate Study, February 2012

Thesis Advisor : Prof. Dr. Birkan YAKAN

ABSTRACT

One of the most important processes in IVF is the selection of embryos of the highest quality for transfer. Conventionally in vitro fertilization centers embryos in various stages of cleavage are assessed according to their morphological features before they are selected. However it is not certain whether or not embryo morphology provides information as regards implantation potential and pregnancy rates.

Intracytoplasmic sperm injection(ICSI), together with technological progress is used to inject a single sperm into an embryo effectively, PICSI dishi is a method used selecting mature sperms in ICSI PICSI dishi is a sterile plastic culture dish to which hyaluronan(HA) has been added. Although it is argued that the aneuploidi proportion in HA-bound sperm selected with PICSI is low this method is thought to offer superior embryo development with positive effect on pregnancy rates.

Our study group consists of women, aged 25-35 years, the causes of whose infertility could not be explained in the in vitro fertilization Unit of the Medical Faculty of Erciyes University, and men with normozoo (20 million and above) sperms. In this study comprised of 50 couples, 24 patients were exposed to ICSI with sperms selected visually by an embryologist and the remaining 26 patients to ICSI with HA-bound sperms attached to HA containing site in PICSI dish. These two groups were compared in terms of embryo development and pregnancy rates.

In our study it was observed that embryo development was similar and the pregnancy rates were 37,5% and 42% with ICSI and PICSI respectively.

In conclusion, we are of the opinion that ICSI with HA-bound sperms and the subsequent embryo development would be of superior quality and therefore would contribute to increasing pregnancy rates.

Key words : ICSI, PICSI, Human sperm, HA-bound, Embryo morphology

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	x
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.İNFERİLİTE	3
2.2.YARDIMLA ÜREME TEKNİKLERİ	4
2.2.1 Oosit toplanması	4
2.2.1.1 OOSİT Temizlik İşlemi.....	5
2.2.2 Semen Örneğinin Alınması, Değerlendirilmesi ve Hazırlanması.....	7
2.2.2.1 Semen Örneğinin Alınması	7
2.2.2.2 Semen Örneğinin Değerlendirilmesi.....	7
2.2.2.3 Semen Örneğinin Hazırlanması	11
2.2.2.3.1.Yıkama	11
2.2.2.3.2.Hareketli Sperm İzolasyonu.....	12
2.2.2.3.3 Gradient Uygulamaları	13
2.2.3 Konvansiyonel İvf.....	14
2.2.4 Mikroenjeksiyon İşlemi (İcsi).....	14
2.2.5 İn Vitro Fertilizasyon	16
2.2.6 Embriyo Transferi	17

Sayfa no

2.3 EMBRİYO SEÇİM KRİTERLERİ	17
2.3.1. Bölünme Evresi Değerlendirilmesi	17
2.3.1.1 Erken Bölünme	17
2.3.1.2. Bölünme Hızı	18
2.3.1.3. Blastomer Büyüklüğü	18
2.3.1.4. Fragmantasyon Derecesi	18
2.3.1.5. Blastomerlerin Nükleer Özellikleri	19
2.3.1.6. Sitoplazmik Görünüm	19
2.3.1.7. Perivitellin Alan ve Zona Pellusida Özellikleri	19
2.4. PICSI DISHI	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1 GEREÇLER.....	21
3.1.1 Demirbaş Malzemeler	21
3.1.2. Sarf malzemeler	21
3.2. YÖNTEMLER.....	22
3.2.1 Hasta seçimi.....	22
3.2.2 PICSI Prosedürü.....	22
3.2.2. 1 Oosit ve spermin toplanması ve değerlendirilmesi	22
3.2.2.2 PICSI dishinin hazırlanması	23
3.2.2.3. Metod	24
3.2.3. Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi.....	25
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	31
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
6. KAYNAKLAR	46
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	: İn vitro fertilizasyon
ÜYT	: Üremeye yardımcı teknikler
YÜT	: Yardımla üreme teknikleri
OPU	: Oosit pick up (Yumurta toplama işlemi)
ET	: Embriyo transferi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
HA	: Hyalüronik asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
SUZI	: Subzonal inseminasyon
PGD	: Preimplantasyon genetik tanı
IUI	: İntrauterin inseminasyon

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1.	3.gün embriyo skorlama tablosu26
Tablo 4.1	ICSI ve PICSİ dishinde gelişen embriyo kalitesi ve gebeliklerinin karşılaştırılması33
Şekil 2.1:	Metafaz II6
Şekil 2.2:	Metafaz I6
Şekil 2.3:	Germinal vezikül içeren oosit6
Şekil 2.4:	Normal morfolojiye sahip Sperm.....9
Şekil 2.5:	Baş anomalisine sahip sperm.....10
Şekil 2.6:	Boyun anomalisine sahip sperm.....10
Şekil 2.7:	Kuyruk anomalisine sahip sperm..... 10
Şekil 2.8	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)16
Şekil 2.9:	Ooplazmasında 2 pronukleus izlenen fertilize olmuş bir oosit..... 16
Şekil 2.10:	Yirmibeşinci saatte erken bölünen 2 hücreli bir embriyo17
Şekil 2.11.	a) ikinci günde 4 hücreli bir embriyo b)Üçüncü günde 8 hücreli bir embriyo18
Şekil 2.12.	PICSİ dishi.....20
Şekil 3.1.	a)Elektron mikroskopunda PICSİ dishi HA bölgesine bağlanan spermeler b)İnvert mikroskopunda PICSİ dishi HA bölgesine bağlanan spermeler24
Şekil 3.2	Blastokist.....27
Şekil 3.3:	5BB-Hatching blastokist.....28
Şekil 3.4:	5BA-Hatching blastokist28
Şekil 3.5:	4AA-Genişlemiş blastokist.....29
Şekil 3.6:	1 Erken blastokist.....29
Şekil 3.7:	2CC-Blastokist.....30
Şekil 3.8:	3BB-Dolu blastokist.....30
Şekil 4.1:	PICSİ ile gelişen embriyo G I.....35
Şekil 4.2:	Görsel ICSI ile gelişen embriyo G I.....35
Şekil 4.3:	PICSİ ile seçilen embriyo G II.....36
Şekil 4.4:	Görsel ICSI ile seçilen embriyo G II.....36

Sayfa No

Şekil 4.5:	PICSI ile seçilen embriyo G III.....	37
Şekil 4.6:	Görsel ICSI ile seçilen embriyo G III.....	37
Şekil 4.7:	PICSI ile seçilen embriyo G IV	38
Şekil 4.8:	PICSI ile seçilen embriyo BLAST 5BA	38
Şekil 4.9:	Görsel ICSI ile seçilen embriyo BLAST 4BB	39
Şekil 4.10:	PICSI ile seçilen embriyo BLAST(3BB).....	39
Şekil 4.11:	Görsel ICSI ile seçilen embriyo BLAST(3BB).....	40

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Fertilizasyon intrauterin inseminasyon'da (IUI) olduğu gibi ya kadın vücudu içerisinde (in vivo) ya da in vitro fertilizasyon ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonun'daki (IVF/ICSI) gibi laboratuvar ortamında (in vitro) gelişebilir. Üremeye Yardımcı Teknikler'de (ÜYT) kadının hazırlanmasında gonadotropinler kullanılarak hormonal stimülasyon ile süperovulasyonun sağlanması, yani kontrollü ovarian hiperstimülasyon, çoğu ÜYT'lerde kritik rol oynar.

Günümüzde 3 çeşit ÜYT uygulaması yapılmaktadır.Bunlar IUI, IVF ve ICSI'dir. IUI spermin yıkanarak iyi motilite ve morfolojideki spermatozoanın konsantre halde uterus içerisine bir kanül vasıtasıyla verilmesi işlemidir. Konvansiyonel IVF ise, kadından toplanan oositlerin bir petri kabı içerisinde spermatozoa ile 24-48 saat inkübe edilmesi, arkasından oluşan embriyoların uterus kavitesine transferini içerir. ICSI'nin uygulanmaya başlamasından sonra konvansiyonel IVF daha az yapılır duruma gelmiştir. ICSI; tek bir spermatozoanın oosit içerisine mikroskop altında mikroenjeksiyonudur.

ICSI işleminde oosit içerisine enjekte edilen spermatozoa mikroskopik olarak en iyi morfolojiye sahip spermatozodur.Mikroskop altında en iyi morfolojiye sahip spermatozoalar baş (akrozom, nukleus), boyun ve kuyruk durumuna göre değerlendirilir.

ICSI işlemi yüksek büyütme mikroskop altında yapılmasına karşılık bu büyütme spermin tam olarak morfolojik yapısını görmemizde yetersiz kalabilmektedir.

PICSI dishinde ise hyaluronan enzimi içeren özel noktacıklar bulunur. Hyaluronan içeren spermler bu özel noktacıklara baş kısmından kıvrak kuyruk hareketiyle yapışırlar. Bu noktaya yapışan HA-bağlı spermin oositi dölleme kapasitesinin ve embriyo gelişimin daha iyi olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada embriyolog tarafından mikroskopik büyütmede en iyi morfolojiye sahip spermler seçilerek yapılan ICSI işlemi ile PICSI dishinde bulunan özel noktacıklara bağlanan HA-bağlı spermler ile yapılan ICSI işleminin embriyo gelişimi ve gebelik üzerine olan etkisini karşılaştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.İNFERTİLİTE

İstem dışı çocuk sahibi olamama veya infertilite, çiftlerin yaklaşık %10-20'sini etkileyen bir problem olup, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıllık süre sonunda gebelik oluşmaması olarak tanımlanmaktadır (1). İnfertilite iki sınıfta değerlendirilir; daha önce hiç gebe kalamayanlar primer infertilite, daha önce gebelik oluşmasına rağmen başka bir gebeliğin oluşmaması durumu ise sekonder infertilite olarak adlandırılır (2). Gebe kalma durumundaki imkansızlık sterilite olarak adlandırılır (3).

İnfertil çiftlerin değerlendirilmesinde etiyolojiyi ve fertilitate prognozunu belirlemek çok önemlidir. Tanı ve prognozu saptarken bazı faktörler üzerinde durulmaktadır (3).

Fertiliteyi etkileyen en önemli faktörlerden biri yaş faktörüdür. Kadında fertilitede azalma 35 yaşından sonra görülür. Yaş ilerledikçe overlerdeki folliküllerin kalitesi azalmaktadır. Fertilize olan ovumun, abortus oranı artmaktadır (3). Pelvik infeksiyon, endometriozis gibi fertilitateyi etkileyebilecek bazı hastalıkların görülme sıklığı otuzlu yaşlardan sonra artmaktadır (3).

Diğer bir faktör, infertilite hikayesinin süresidir. İnfertilite araştırılmaya başlanırken gebeliğe maruz kalabilme süresi de belirlenmelidir. Korunulmayan cinsel ilişkinin ilk ayında yaklaşık olarak kadınların %25'i gebe kalabilir. Bir yılın sonunda gebe kalma süreleri ilk 6 ayda %63, ilk 9 ayda %75, bir yılın sonunda %80-90 iken bunu takip eden 6 aylık bir sürede ise sadece %3-5'lik bir artış olur (3).

Sonuç olarak, korunmasız bir yıllık ilişki sonucunda gebeliğin oluşmaması araştırmanın başlaması için yeterlidir. Kadının yaşı ve infertilitenin süresi problemin ağırlığını belirleyen prognostik belirtilerdir (3).

Çiftlerde infertilite kadın, erkek veya her ikisinde birlikte bulunan problemlere bağlı olabilir. İnfertil çiftlerin %30'u kadına bağlı, %30'u erkeğe bağlı nedenlerden dolayı çocuk sahibi olamamaktadır. Çiftlerin %40'ında ise, infertilite her ikisindeki problemlere bağlı olmaktadır (4).

2.2.YARDIMLA ÜREME TEKNİKLERİ

Overden oosit alınmasını takiben yapılan işlemlere, Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT) adı verilir. 25 Haziran 1978 tarihinde, fizyolog Robert Edwards ve jinekolog Patrick Steptoe ilk IVF bebeği olan Louise Brown'un doğumunu bildirdiler. Bu olayın ardından üreme tıbbında çok hızlı gelişmeler kaydedildi.

YÜT de başarıyı etkileyen en önemli faktör, hasta seçimidir. Başlangıçta tubal faktör için kullanılan IVF, zamanla yaygınlaşarak günümüzde geleneksel tedavi yöntemleriyle başarı sağlanamamış tüm infertil çiftlerde kullanılır hale gelmiştir. YÜT'nin uygulanmasında temel kısıtlayıcı etken kadın yaşı ve buna bağlı azalan over rezervidir (5).

2.2.1 Oosit Toplanması

IVF de ilk hedef yeterli sayıda fertilizasyon yeteneğine sahip oosit elde edebilmektir. Doğal sıkluslarda bir oosit elde edilir ve siklus iptal oranları yüksektir. Bu nedenle IVF sikluslarında, kontrollü ovaryen hiperstimülasyon (KOH) yapılmaktadır. Optimal sayıda ve kalitede oosit elde etmek için, her hastanın kendi özelliklerine uygun KOH protokolü düzenlenmektedir (6-8). Ovaryan stimülasyon sırasında folliküler gelişim, ultra-sonografi ölçümleri ve eş zamanlı olarak yapılan östrojen (E₂) takibiyle izlenir. Oosit pick-up'dan (OPU) önce folliküllerden en az üç tanesinin 17 mm. ve üzerinde olması ve bu dönemde her bir follikül için E₂ değerinin 800-1000 pmol/L. olması halinde; ovulasyon, İM hCG uygulaması ile tetiklenir. hCG uygulaması ile oosit ve granüloza hücreleri arasındaki hücresel ilişkiler yıkılır, ooplazmadaki kortikal granüller merkezden perifere doğru göç eder, oosit 1. mayoz bölünmenin profaz evresini tamamlayarak 2. mayoz bölünmenin metafaz evresine geçer ve bu evrede kalır. Bu son gelişmelerin sonucunda çekirdek zarı yıkılır ve 1. kutup cisimciği atılır. Sayılan

gelişmeler 36 saatlik bir süreçte tamamlandığından OPU, hCG enjeksiyonundan 35-36 saat sonra planlanmalıdır.

Oosit toplama prosedürlerinde yaşanan bir diğer önemli değişiklik de oositlerin laparoskopi ile değil; transvajinal yolla ultrasonografi rehberliğinde gerçekleştirilmesidir (6). Aspire edilen oositler spesifik kültür ortamında yıkanarak embriyolog tarafından matürasyonuna göre değerlendirilerek derecelendirilir.

Klasik IVF'de oosit-kumulus-korona kompleksinin (Oocyte-Cumulus-Corona Kompleks, OCCC) değerlendirilmesi sadece oositlerin matürasyonu hakkında bilgi vermekte, morfolojik yapıları konusunda ise yeterince aydınlatıcı olmamaktadır.

ICSI işlemi yapılacak ise bu işlemden önce oositin çevresindeki hücreler kimyasal ve mekanik yöntemlerle uzaklaştırıldığı için oosit matürasyonu ve yapısal özellikleri daha net olarak gözlenebilmektedir (7).

2.2.1.1 Oosit Temizlik İşlemi

Kullanılan hyalüronidaz (HYASE™-10X) kumulus ve korona hücrelerinin oosit etrafından enzimatik yolla uzaklaştırılmasını sağlayacaktır. Kumulus kompleksi ayrıştırılarak temizlenen oositler, embriyolog tarafından matürasyon değerlendirilmesine alınır.

1. Polar cisimciğini atmış homojen görünümlü sitoplazması olan oosit Metafaz-II olarak değerlendirilir (Şekil 2.1).
2. Polar cisimciği olmayan oositler Metafaz-I olarak tanımlanır (Şekil 2.2).
3. Birinci polar cisimciği olmayan ve germinal vezikül (GV) içeren oositler immatür olarak sınıflanırlar (Şekil 2.3).



Şekil 2.1: Metafaz II



Şekil 2.2: Metafaz I



Şekil 2.3: Germinal vezikül içeren oosit

2.2.2 Semen Örneğinin Alınması, Değerlendirilmesi ve Hazırlanması

2.2.2.1 Semen Örneğinin Alınması

Semen analizinden sağlıklı sonuç alabilmek için cinsel perhiz süresinin en az iki en fazla sekiz gün olması gerekmektedir. Bu sürenin kısalması sayı ve volümü; uzaması ise hareketliliği olumsuz etkileyecektir. Örnek, mastürbasyon yoluyla ya da spermid içermeyen özel prezervatifler kullanılarak cinsel ilişki sonrasında toplanabilir. Ancak günümüzde mastürbasyon ile örnek alınması tercih edilmektedir, örneğin verilmesinden itibaren ejakülataın 5-30 dakika içerisinde likefiye olması (sıvılaşması) gerekir. Semen in koagüle olmasına neden olan faktörler seminal vezikül; likefiye olmasını sağlayan proteolitik enzimler ise prostat kaynaklıdır.

2.2.2.2 Semen Örneğinin Değerlendirilmesi

- Sperm Sayımı

Ejakülatta bulunan sperm sayısı likefaksiyonunu tamamlamış örnekte iki yöntemle değerlendirilebilir: 1) Spermilerin hepsi immobilize edilerek sayım yapılır ya da 2) Hareketli ve hareketsiz sperm birliktede değerlendirilir. Sperm sayımı için hemositometre (Hausser Scientific), microcell (Conception Technologies), CellVU (Millennium Sciences Inc.), Standard Count (Humagen), Makler (Sefi-Medical Instrument) gibi çeşitli sayım kamaraları tanımlanmış olmakla birlikte günümüzde yaygın olarak Makler sayım kamarası kullanılmaktadır. Sağlıklı bir sonuç alabilmek için 100 karelik alan içerisinde en az on karede sayım yapılır ve on karede saptanan sayı milyon/ml. olarak sonuç verir.

- Sperm Hareketliliği (*Sperm Motilitesi*)

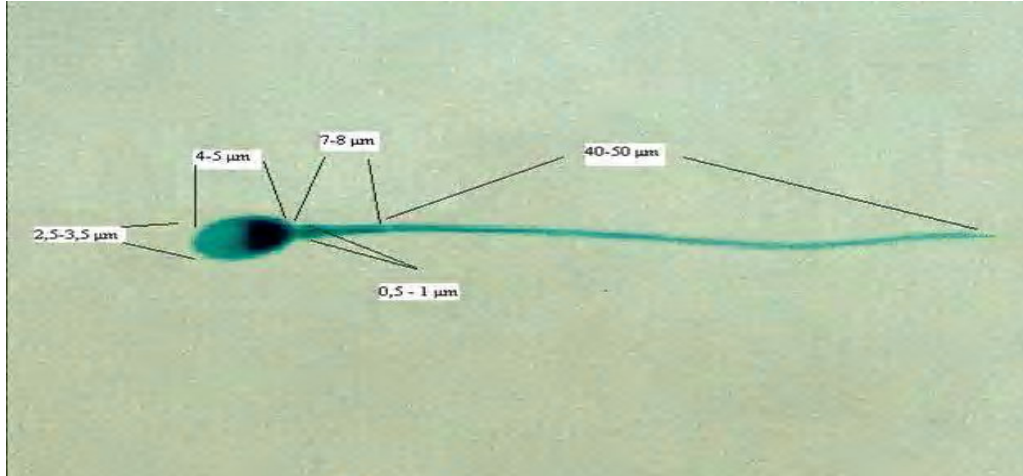
Isının, sperm motilitesini etkileyen önemli bir faktör olması nedeniyle sayım kamaralarının hareketlilik değerlendirmesinden önce 37°C'de tutulmasına dikkat edilmelidir. Hareketlilik; progressif hareketli sperm, hareketli sperm ve hareketsiz sperm olarak 3 ana grupta değerlendirilmelidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan ve semen analizini standardize etmeye yönelik laboratuvar kılavuzu sperm hareketliliğini a,b,c,d olmak üzere 4 kategoride değerlendirmektedir. Günümüzde androloji laboratuvarları tarafından sıklıkla kullanılan sınıflandırma da bu temele dayanmaktadır.

Buna göre;

- a) Hızlı, progressif hareketlilik.
- b) Yavaş ya da duraklayarak hareket eden spermleri tanımlar,
- c) Yerinde hareketlilik (5µm./saniyelik süratle hareketi belirler),
- d) Hareketsiz spermleri ifade eder.

-Sperm morfolojisi

Semen analizinde değerlendirilen en önemli kriter, spermin yapısal özelliklerinin incelenmesine dayanan morfolojik sınıflandırmadır. Ancak sperm formlarındaki çeşitlilik, sperm morfolojisi değerlendirmesini zorlaştıran bir unsur olarak kabul edilmektedir. Sperm morfolojisi ile ilgili ilk çalışmalar normal ve anormal formların tanımlanması şeklinde olmuştur. İn vivo koşullarda ejakülasyon sonrasında servikal mukus bariyeri ile karşılaşan sperm burada bir anlamda filtre edilmekte ve ancak fertilizasyon kapasitesi yüksek olduğu düşünülen spermler bu bariyeri geçebilmektedir. Bu nedenle normal formların tanımlanması post koital testlerden elde edilen örneklerle ve zona pellusidaya bağlanan spermlerin yapısal özellikleriyle tanımlanmıştır (8-11). Dünya Sağlık Örgütü'nün önceleri %50, daha sonra %30 olarak verdiği normal sperm morfolojisine ait alt sınıra karşılık; Kruger kriterleri ile değerlendirmede bu alt sınırın altında %5 olduğu ortaya koyulmuştur. Sperm morfolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle zona pellusidaya bağlanan spermlerin morfolojik değerlendirilmesi sonrasında tanımlanmış ve bu çalışmalar Kruger kriterlerinin belirlenmesinde öncü olmuştur. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar, IVF olgularında fertilizasyon yüzdeleri ile ve ayrıca fertil erkek popülasyonu üzerindeki çalışmalarla güçlenmiş ve sonuçta WHO kriterleri ile değerlendirilen sonuçların Kruger kriterlerinden daha zayıf tanısal değeri olduğu gözlenmiştir (12-16). Morfolojik değerlendirme yaparken kullanılan boyama yöntemine göre spermler farklı boyutlarda görülebilir, çünkü boyama öncesi yapılan fiksasyon sırasında spermler bir miktar büzülür. Diff Quik yönteminde fiksasyon ve boyama işlemi kısa sürdüğünden spermler gerçek boyutlarına yakın görünümdeyken Papanicolau ya da Spermac ile yapılan boyamalarda daha küçük görünecektir (17). Normal morfolojiye sahip spermler (Şekil 2.4). aşağıdaki kriterlere sahip olmalıdır.



Şekil 2.4: Normal morfolojiye sahip sperm

Baş: 2-3 μm . en ve 4-5 μm . boyda, konturları düzgün, oval, akrozom, başın %40-%70'ini kaplayacak şekilde olmalı ve vakuol içermemeli, ekvatoriyal segment de konturlara uygun olmalıdır. Baş anomalileri küçük, büyük, yuvarlak, uzamış, amorf, vakuollü olarak sınıflandırılabilir, bu anomalilere tek tek rastlanabileceği gibi birkaçı bir arada da bulunabilir. Özellikle total teratozoospermi, globozoospermi ve megalozoospermi gibi ciddi morfolojik anomalilerin fertilizasyon, gebelik ve implantasyon üzerine olumsuz etkisi gösterilmekle birlikte; ICSI'nin erkek infertilitesi tedavisinde kullanılmasıyla kötü sperm profillerinin sayılan parametrelerdeki önemi azalmıştır (18-23). Çünkü, kadın genital organlarındaki servikal mukus gibi bariyerlerin geçilmesi ve spermın zona pellusidaya bağlanmasında etkili bir parametre olan spermın normal olması gerekliliği; ICSI'de tüm bu doğal gelişmelerin bypass edilmesi nedeniyle geçerliliğini kaybetmiştir (24-25). Ayrıca, mikroenjeksiyon öncesi fertilizasyon, gebelik ve implantasyona engel olabileceği tahmin edilen ciddi morfolojik anomaliye sahip spermın ICSI işlemi sırasında embriyolog tarafından seçilmeyen hücreler olacaktır. Ancak yine de; ICSI işleminde kullanılan mikroskopik büyültme, morfolojik olarak en iyi spermın seçilmesine yetmeyebileceği gibi (26), morfolojik inceleme ile görülemeyen, sperm organellerindeki bazı anomaliler ICSI sonuçları üzerine etkili olabilmektedir (52). Baş anomalilerinden özellikle globozoospermi ve megalobaş anomalisi, klinik yaklaşım açısından en önemli morfolojik anomalileri oluşturmaktadır (27) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5:Baş anomalisine sahip sperm

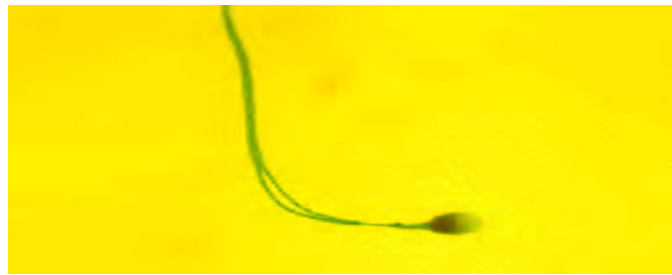
Boyun: 4-5 μm . uzunluğunda ve düzgün olmalı ve başın alt kısmına, aksiller konumda bağlanmalıdır. Boyun bölgesinde bulunabilen sitoplazmik cisimcik (sitoplazmik droplet) başın yansından daha büyük olmamalıdır. Kaim ya da irregüler boyun anomalileri görülebilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6:Boyun anomalisine sahip sperm

Kuyruk: 50-55 μm . uzunlukta, düzgün kıvrımlı, boyun kısmından daha ince olmalı ve son kısma doğru giderek incelmelidir. Kısa, kırık, birden fazla kuyruk, kendi ekseni etrafında kıvrılmış, kalın küt görünümlü kuyruklar kuyruk anomalilerine işaret eder .

Günümüzde erkek infertilitesini ortaya koyan en önemli parametre; kesin kriterlerle saptanan yapısal özelliklerle progressif sperm sayısının birlikte değerlendirilmesidir (28) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7:Kuyruk anomalisine sahip sperm

2.2.2.3 Semen Örneğinin Hazırlanması

În vitro fertilizasyon uygulamalarının ilk yıllarında tüm dikkatler oosit üzerinde yoğunlaştırılmış olup, semen içerisindeki sperm hücrelerinin her koşulda fertilizasyonu gerçekleştirebileceği düşünülmüştür. YÜT son 20 yıl içerisindeki gelişimi sayesinde gametler, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi ile ilgili önemli bilgiler edinilmiştir. İnsan spermelerinin in vitro koşullarda fertilizasyon yeteneği, semen içerisindeki enzimler ve/veya sperm hücresi testis dokusundan izole ediliyorsa, in vivo koşullar ile doğru orantılıdır. Koitus sonrası vajinaya bırakılan semen içerisindeki sperm hücreleri servikal mukus tarafından süzülür ve fertilizasyon potansiyeli en yüksek olan spermeler fertilizasyonun gerçekleşeceği Fallop tüplerine ulaşır. İn vitro koşullarda ise bu süreç sperm hazırlama protokolları ile gerçekleştirilir. Bu amaçla yıllar içerisinde in vitro koşullarda IUI , IVF ya da ICSI işlemleri için birçok sperm hazırlama protokolları denenmiştir. Bu protokollar içerisinde en çok kullanılanlar; yüzdürme (swim-up)(29), swim-down (30), sedimentasyon (31), cam yüzünden filtrasyon (32), Percoll (33) ya da Nycodenz (34) gibi viskoz maddeler arasından süzme yöntemleridir. Tüm yöntemlerdeki ortak amaç; seminal plazma ve içerisindeki sperm dışı hücreler ve biyokimyasal ajanların uzaklaştırılıp, fertilizasyon kapasitesi en yüksek spermelerin ayrıştırılmasıdır. Sperm hücrelerinin inseminasyon için hazırlanması sırasında mümkün olduğunca az hasar görmesi gerektiğinden semenden ayrıştırılan sperm hücreleri in vivo koşullara yakın özellikleri taşıyan kültür sıvıları içerisinde alınmalıdır.

Hazırlama Protokolları

Günümüze dek tanımlanmış sperm hazırlama protokolları içerisinde sadece yıkama, yüzdürme ve gradient uygulamaları geniş kullanım alanı bulmuştur. Bu teknikler zaman zaman tek başına, zaman zaman kombine olarak kullanıldığında başarılı sonuçlar vermektedir.

2.2.2.3.1. Yıkama

En basit protokoldür. Santrifüj sonrasında spermelerin mümkün olduğunca küçük bir hacimde toplanmasını sağlamak amacı ile konik dipli, 14 ml. hacimli steril tüpler kullanılır. Ejakülat 1/2 (vol/vol) oranında kültür sıvısı ile dilüe edilir. 300g de 10 dakika santrifüj edildikten sonra dipte kalan pelet bozulmayacak şekilde üstteki sıvı yavaşça pipete edilir. Pelet üzerine 3 ml. kültür sıvısı konular, pelet ile yavaşça karıştırılır ve

tekrar santrifüj uygulanır. Santrifüj sonrası üst kısım pipete edilip atılır ve tüpün dibinde kalan pelet 0,5 ml. kültür sıvısı ile dilüe edilir (35).

2.2.2.3.2.Hareketli Sperm İzolasyonu

Yıkama protokollarında semen içerisindeki tüm hücreler hazırlanmış olmasına rağmen, önemli olan bu hücreler içerisinden inseminasyon için gerekli motil ve morfolojik olarak normal sperm popülasyonunun izolasyonudur. Bu amaçla tanımlanmış olan swim-up, swim down gibi değişik yüzdürme protokolları ile hareketli spermelerin temiz kültür ortamları içerisine yüzdürülmesi sağlanır.

Yıkama aşamasından geçirilmiş örneklerin üzerine 1 ml. kültür sıvısı eklenerek temiz medium içerisine spermelerin yüzdürülmesi (*swim-up*) en sık kullanılan yöntemdir. Yıkama sonrasında elde edilen 0,5 ml.lik örnek yavaşça pipete edilerek homojen bir karışım elde edilir. 1 ml. kültür sıvısı bu karışımın üzerine yavaşça bırakılarak, 2 ayrı katman oluşumu sağlanmalıdır. Tekniğin başarılı olabilmesi için alt ve üst katmanların birbirine karıştırılmaması gerekir. Spermelere yüzebilecekleri maksimum yüzey alanı sağlamak için konik dipli tüpe 45 derece eğim verilerek %5 CO₂,’li inkübatöre yerleştirilir ve 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında üst kısımdaki sıvının 3/4’ü (yaklaşık 0,75 ml.) dikkatli bir şekilde pipete edilerek steril bir tüp içerisine alınıp bu örnekten sayım yapılır.

Yüzdürme protokollarından bir diğeri de swim-down’dur. Bu kez konik tüpler içerisine konmuş 1 ml. kültür sıvısı üzerine semen örneği katmanlandırılıp inkübe edilir ve dipteki sıvının 3/4’ü alınarak sayım yapılır ve inseminasyon için kullanılır.

Total motil sperm sayısı çok düşük ve / veya morfolojinin %5’in altında olduğu olgularda yüzdürme yöntemlerinin başarısı kısıtlıdır. Bu nedenle özellikle mikroinseminasyon (ICSI) uygulanacak vakalarda yıkama sonrasında elde edilen sperm hücrelerini içeren pelet 0,3 ml. kültür sıvısı ile dilüe edildikten sonra ufak petri kaplarının ortasına yerleştirilir. Kenarlara koyulacak 20 ml. temiz kültür sıvılarından uzantılar hazırlanır ve kültür kabı parafin yağı ile kapatılarak %5 CO₂,’li, inkübatörüne yerleştirilir, 1 saatlik inkübasyon sonrasında temiz sıvılara doğru yüzen spermeler, ince çekilmiş Pasteur pipeti ile ya da mikromanipülasyon pipetleri ile toplanarak inseminasyon için kullanılır.

2.2.2.3.3 Gradient Uygulamaları

Günümüzde en sık kullanılan yöntemdir. Teknik kısaca; Percoll, albumin, Nycodenz, Ficoll ve sükröz polimerleri gibi malzemelerle gradientler oluşturup sperm hücrelerinin santrifüj yardımı ile bu sıvı kolonlardan süzdürülmesidir (36). Özellikle suboptimal sperm örneklerinde tercih edilir. Polivinilpirolidon (Polyvinylpirolidone, PVP) ile kaplı kolloidal silika partikülleri içeren Percoll solüsyonu bu yöntemde kullanılan ilk materyaldir. Günümüzde kültür ortamları üreticileri değişik isimlerde gradientler üretirler ve tümündeki ortak özellik, kolloidal silika partikülleri içermeleridir. Percoll, geçmişte yaygın kullanım alanı bulmuş olmasına rağmen endotoksin kontaminasyonu olasılığı nedeniyle günümüzde Nycodenz içeren solüsyonlar tercih edilmektedir.

Gradient uygulamalarında 2 katman kullanılır, gradient konsantrasyonları azaldıkça elde edilen sperm sayısı daha fazla olmasına rağmen, normal ve dolayısı ile fonksiyonel olan spermler daha yoğun olduğundan alt katmanın konsantrasyonu yüksek tutulmalıdır. Yapılan çalışmalarda alt katman konsantrasyonları %72 ile %95 arasında denenmiş %80 eşik değer olarak kabul edilmiş ve alt tabakada en az %80 konsantrasyonun kullanılması önerilmiştir (37). Uygulamalarda genellikle %90 gradient konsantrasyonu tercih edilir.

Santrifüj hızı 300g olarak uygulanmalıdır. Santrifüj süresi ile ilgili çalışmalarda; sürenin uzaması ve santrifüj hızının yükselmesine bağlı olarak spermin hasar görme ihtimalinin arttığı gözlemlenmiştir (38).Bu nedenle uygulamalarda g gücü, sperm değerleri göz önüne alınarak santrifüj uygulama protokolü belirlenmelidir.

Steril konik dipli 14 ml. hacimli tüpe %90 konsantrasyonda 1 ml. solüsyon konulur. Üzerine 1 ml. %50'lik konsantrasyondaki solüsyon tüp kenarından yavaşça akıtılarak eklenir ve tabakalar oluşturulur. Bu tabakaların üzerine en fazla 2 ml. semen eklenerek 20 dakika santrifüj edilir. Rutin olarak gradient işlemlerinde 18 dakika 600 g uygulanmaktadır. Santrifüj sonrası dipte kalan 0,5 ml. dışındaki kısım tüp dışına alınarak dipte kalan kısmın üzerine 3 ml. kültür sıvısı eklenerek yıkama işlemi uygulanır, bol miktarda kültür sıvısı ile yıkamadaki amaç; silika partiküllerinin uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Supernatan uzaklaştırılırken pelete dokunmamaya ve pipetleme sırasında anaför oluşturmamaya özen gösterilmelidir. Bu amaçla bu işlem için otomatik pipetörlerin kullanılması uygundur.

Semen hazırlığından sonra sperm sayısı ve hastanın özgeçmişine bakılarak konvansiyonel IVF yada ICSI yapılacağına karar verilir.

2.2.3 Konvansiyonel IVF

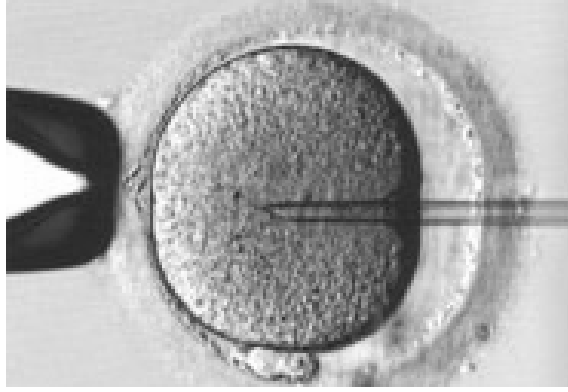
Oosit toplama işlemi tamamlandıktan ve oositlerin matürasyon değerlendirilmesi yapıldıktan sonra insemine edilecek oositler tek tek temiz kültür dropletine alınır, oositlerin kumulusları iğnelerle hafifçe, çok dikkatlice, oositlere zarar vermeden ayrıştırılır. Buradaki amaç fertilizasyon şansını artırmaktır. Daha sonra hızlı bir şekilde 20-50 IVF™-50 droplet içerisinde her bir oosit başına 50.000- 250.000 motil sperm/ml olabilecek şekilde aşağıdaki gibi belirlenmiş ve hesaplanmış sperm örneği mikropipetör ile yavaşça oositlerin yanına bırakılır. Bütün bu çalışma mineral oil altında yapılır. İnseminasyon için 50.000 sperm/ml'in altında bir konsantrasyon kullanılması optimal değildir. Çok yüksek konsantrasyonda sperm kullanılması da polispermik fertilizasyona neden olabileceği gibi ortamda metabolik yıkım ürünlerinin artmasına neden olarak oosit ve gelişecek olan embriyoların vitalitelerini etkileyebilir.

2.2.4 Mikroenjeksiyon İşlemi (ICSI)

ICSI tek bir sperm hücrelerinin oosit içerisine enjeksiyonu işlemidir. İşlem x400 büyütme altında inverted mikroskobun ısıtılmış tablası (heating stage) üzerinde gerçekleştirilir. Oosit ve PVP içerisinde spermleri içeren ICSI dropletlerini kapsayan dish inverted mikroskobun önceden ısıtılmış tablası üzerine yerleştirilir. PVP dropletinin spermlerin yoğun olarak bulunduğu kenar kısmı ve enjeksiyon pipeti net olarak görüntüye getirilir ve enjeksiyon pipetine az miktarda PVP çekilir. Hareketli ve nispeten morfolojisi normal olan bir sperm seçilir ve mikropipet yardımıyla enjeksiyon pipetinin uç kısmı sperm kuyruğunun üzerine getirilir. Spermin kuyruğu, pipet ile dishin tabanı arasında sıkıştırılarak immobilizasyonu sağlanır. Bu uygulama sperm membranının destabilize ederek spermin motilitesinin bozulmasına yol açtığı gibi, sitoplazmada bulunan oosit aktive edici faktörün de salınmasını sağladığı belirtilmektedir. Bu işlem sırasında spermin, hücre bölünmesi aşamasında kromozomların göçü için hayati öneme sahip olan, sentriolü içeren boyun kısmına hasar verilmemesi çok önemlidir. Kuyruk kısmının sıkıştırılması işleminin yetersiz olması yani immobilizasyon işleminin yeterince agresif yapılmamasının fertilizasyon oranlarını azalttığı bildirilmektedir. Daha sonra immobilize olan sperm önce kuyruk kısmı pipete girecek şekilde enjeksiyon pipetinin içerisine aspire edilir. Spermi içeren mikroenjeksiyon pipeti PVP içerisinden çıkarılarak

enjeksiyon yapılacak olan ilk oositi içeren droplet görüntüye getirilir. Oosit görüntüde iken tutucu pipet (holding pipet) görüntüye getirilir ve mikropipet yardımıyla yaratılan negatif basınç ile saat 9 hizasından oosit tutulur ve stabilize edilir. Bu şekilde polar cisimciğin saat 6 ya da 12 hizasında bulunması sağlanır. Bu sayede polar cisimciğin hemen alt kısmında mayoz içcikleri ve kromozomların ICSI işleminden en az zararı göreceği düşünülmektedir. Sperm içeren enjeksiyon pipeti görüntüye getirilerek holding pipetin aksi tarafından saat 3 hizasından oosite yaklaştırılır. Mikroenjeksiyon işlemi x400 büyütme altında yapılır. Pipet içindeki sperm pipetin uç kısmındaki fazla PVP solüsyonu dışarı çıkarılacak şekilde pipetin uç kısmına kadar hareket ettirilir. Böylece mümkün olduğunca az miktarda PVP oosit içerisine enjekte edilecektir ve mikromanipülatör yardımıyla enjeksiyon pipeti oosit içerisine ilerletilir. Pipetin karşı tarafa doğru esneyen oosit membranı (oolemma) geçilip sitoplazma (ooplazma) içerisine girilene kadar ilerletilmesi gerekir. Bu aşamada mikropipete uygulanan az miktardaki negatif basınç ile oosit membranı kırılıncaya kadar sitoplazma pipet içerisine aspire edilir (sitoplazmanın aspirasyonu başarılı bir fertilizasyon için gerekli olan oosit aktivasyonunu sağlamaktadır). Oosit membranı kırılır kırılmaz mikromanipülatörün mikrovidası aksi yönde hareket ettirilerek aspire edilen sitoplazma ile birlikte pipet içerisindeki sperm oosit içerisine bırakılır.

ICSI prosedürünün temeli oosit ve sperm manipülasyonlarına dayanmaktadır. İlk olarak sperm penetrasyonunu kolaylaştırmak amacıyla parsiyel sperm zona diseksiyonu (PZD) geliştirilmiştir (39-40). Zona pellucida tarafından oluşturulan fertilizasyon bariyeri mekanik olarak inceltirilerek insemine edilmiş sperm hücrelerinin oositin perivitellin aralığına direkt olarak geçişi sağlanır. Bu tekniği takiben subzonal inseminasyon (SUZI) yöntemi geliştirilmiştir (41-42). SUZI işlemi yüksek sayıda motil sperm hücrelerinin bir enjeksiyon pipeti yardımıyla perivitellin aralığına direkt olarak bırakılmasını sağlamaktadır. ICSI prosedüründe SUZI işleminden farklı olarak tek bir sperm zona pellucidadan sonra ikinci bir bariyeri; oolemmayı geçerek enjekte edildiği için daha invaziv bir yöntemdir (43).



Şekil 2.8 İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)

İnsanlarda ICSI yöntemi ile elde edilen ilk gebelikler 1992 yılında gerçekleştirilmiştir. ICSI prosedürünün ortaya çıkışından çok kısa bir süre sonra fertilizasyon oranlarının, gelişen embriyo sayısının ve implantasyon oranlarının SUZI'ye göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (44-45). Günümüzde ICSI uygulaması şiddetli oligoasteno-teratozoospermik vakalar ve testiküler disfonksiyon ya da ekskretuar kanallarda obstrüksiyon sebebiyle ortaya çıkabilen azospermik vakalarda tüm dünyada yaygın olarak uygulanan tek tedavi biçimidir (46).

2.2.5 İn Vitro Fertilizasyon

Fertilizasyon kontrolü klasik IVF'de inseminasyondan 18-20 saat sonra,ICSI uygulamalarında ise 14-18 saat sonra yapılır.Oositlerin sitoplazmasında iki pronukleus (2PN) ve perivitellin aralıkta iki kutup cisimciğinin görülmesi fertilizasyonun gerçekleştiği anlamına gelir.İncelenen hücrenin üç boyutlu olması nedeniyle kutup cisimcikleri her zaman görüş alanında olmayabilir. Bu nedenle oositin iki pronukleus içermesi halinde fertilizasyonun gerçekleştiği kabul edilmelidir (47)(Şekil 2.9).



Şekil 2.9:Ooplazmasında 2 pronukleus izlenen fertilize olmuş bir oosit

2.2.6 Embriyo Transferi

Laboratuvar ortamında elde edilerek ,seçilen en iyi kalitedeki embriyoların bir katatere yüklenerek uterusu bırakılması,embriyo transferi (ET) olarak tanımlanır (48-49).IVF 'deki ulaşılan başarı oranları,embriyonun tranfer edildiği döneme ve kalitesine bağlı olarak değişmekle birlikte; 2ve3.gün embriyo transferinde gebelik oranı %20-40, implantasyon oranı %10-20; 5ve 6.gün ET başına gebelik oranı >%60,implantasyon oranı%50 olarak bildirilmektedir (50).

2.3 EMBRİYO SEÇİM KRİTERLERİ

2.3.1. Bölünme Evresi Değerlendirilmesi

Embriyo skorklama sistemlerinde, yüksek implantasyon potansiyeline sahip embriyoları seçebilmek için, pronükleer evre ile birlikte bölünme evresi de değerlendirilmelidir. Bölünme evresinde erken bölünmenin (early cleavage, EC) saptanması ve daha sonra bölünme hızı, blastomerlerin şekli ve boyutu, fragmantasyon oranı, blastomerlerdeki nükleus sayısı, sitoplazmik görüntü, perivitellin alan ve zona pellusida özellikleri gibi kriterler değerlendirilmektedir .

2.3.1.1 Erken Bölünme

Fertilize olmuş bir oosit, yaklaşık 20 saat sonra ilk mitotik bölünmeye başlayarak 2 hücreli bir embriyo oluşturmaktadır (Şekil 2.10). Yirmibeşinci saatte fertilize olmuş oositlerin' yaklaşık %20'si 2 hücreli evreye ulaşırlar. Bu embriyolar, erken bölünen embriyo olarak adlandırılır. Yapılan araştırmalar erken bölünen embriyoların daha yüksek gebelik ve implantasyon potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir (51).



Şekil 2.10: Yirmibeşinci saatte erken bölünen 2 hücreli bir embriyo

2.3.1.2.Bölünme Hızı

İyi kalitedeki bir embriyonun, ikinci günde (42-44. saat) 4-5 blastomere ve üçüncü günde (66-68.saat) en az 7 blastomere sahip olması gerekmektedir (52).



Şekil 2.11.a) İkinci günde 4 hücreli bir embriyo



Şekil 2.11 .b) Üçüncü günde 8 hücreli bir embriyo

2.3.1.3.Blastomer Büyüklüğü

Eşit olmayan hücresel bölünme, embriyo kalitesi ve embriyonun gelişim kapasitesi ile ilgili bilgi veren bir diğer önemli parametredir. Yapılan çalışmalar, eşit bölünmeyen embriyoların transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir.

Bunun da protein, mRNA, mitokondri ve diğer hücre organellerinin iki kardeş hücreye eşit olarak aktarılamamasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (53).

2.3.1.4.Fragmantasyon Derecesi

Bölünme hızı ve blastomer boyutuyla birlikte embriyo fragmantasyonu da embriyo seçim kriterleri arasında yer almaktadır. Nükleus içermeyen fragmanların sayısı ve miktarının embriyo hacmine oranı, embriyo kalitesi değerlendirilirken belirlenmelidir. Hücre fragmantasyonunun nedeni ve embriyo gelişimine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte hem embriyo hem de hastaya spesifik bir durum olarak ortaya çıkabilmektedir. Fragmantasyonun, apoptozisten (programlı hücre ölümü) kaynaklandığı görüşü yaygındır (54).

2.3.1.5.Blastomerlerin Nüklear Özellikleri

Embriyoların implantasyon potansiyelini belirleyen diğer bir morfolojik parametre ise blastomerlerde gözlenen multinükleasyondur. Blastomer multinükleasyonunu, bir blastomerin içinde iki veya daha çok sayıda ya da fragmente olmuş nükleusun bulunması ile karakterizedir (52).

2.3.1.6.Sitoplazmik Görünüm

Embriyoda blastomerlerin sitoplazması açık renkli, şeffaf ya da hafif granülasyona sahipse, normal olarak değerlendirilir (55). Yapılan çalışmalarda bazı 3. gün embriyolarının sitoplazmasında granülasyon ve küçük noktasal yapıların arttığı gösterilmiş ve bu durumun blastomerin sitoplazmik aktivitesinin yeterli olduğunun bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. Sitoplazmik görüntünün embriyo gelişim potansiyeli üzerine etkisini araştıran bir çalışmada gebelik ve implantasyon oranlarını etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır (56).

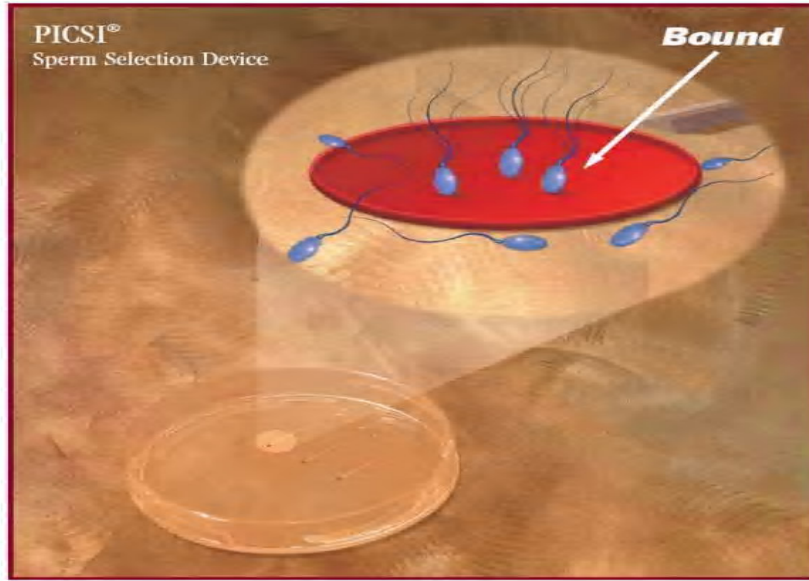
2.3.1.7. Perivitellin Alan ve Zona Pellusida Özellikleri

Embriyoların değerlendirilmesi sırasında perivitellin aralıkdaki genişlik,darlık ve inklüzyonlar not edilmelidir.Ayrıca zona pellusida yapısı ve kalınlığı da değerlendirilmelidir.

2.4.PICSI DISHI

PICSI dishi, infertil çiftlerin ICSI tedavisinde miroenjeksiyon için olgun sperm seçiminde kullanılır. PICSI dishi özel noktacıklarında hyaluronan içeren bir petri kabıdır.

PICSI dishi tabanın iç kısmına üç mikro nokta halinde hyaluronan eklenmiş plastik bir dishtir. Taban kısmında mikro noktaların yerini belirlemek için kabartma şeklinde üç tane çizgi bulunmaktadır. Mikro noktalar belirleme çizgilerinin bittiği yerde olup yaklaşık 2 mm genişliğinde ve 3 mm uzunluğundadırlar.



Şekil 2.12.PICSI dishi

Hyaluronan oositi çevreleyen cumulus oophorus tabakasının ana bileşenlerinden biridir. Olgun bir spermin baş kısmı spermin hyaluronana bağlanmasını sağlayan hyaluronana özel reseptörler barındırır (61). Spermatogenez sırasında plazma membranının yeniden şekillenmesi ile düzenlenmekte olan sperm-zona bağlanma alanı ile HA reseptörünün biçimlenme alanının benzer olduğu ve matür spermatozoanın HA alanının seçebilmekte olduğu farz edilmektedir. Spermin zona pellusida'da olduğu gibi HA'ya bağlanma bölgesinde baş kısmıdır (57). Geleneksel ICSI uygulamalarında enjeksiyon için seçilecek sperm görsel olarak morfolojileri ve motiliteleri baz alınarak seçilir. Fakat bu yaklaşım spermin genomik bütünlüğünü ve zigota en iyi kalıtsal özellikleri sağlayacağı anlamına gelmez. PICSI dish olgun spermilerin hyaluronan hidrajele bağlanma özelliği sayesinde sperm seçiminde etkin bir araçtır. PICSI; doğal döllenmenin önemli bir seçim aşaması olan, spermin cumulus oophorus'a bağlanmasını taklit eder. HA bağlanması ile bu yeni sperm seçim yönteminin gelişimi, spermatogenez sırasında spermin bağlanma bölgesinin tanınmasına, zona pellusida'ya bağlanmasının plazma membranının yeniden şekillenmesi ile formasyonuna ve HA bağlanma bölgesinin genel olarak düzenlenerek tanınmasına dayalıdır (63-65).

Membranın yeniden şekillenmesinde başarısız olan immatür sperm immobilize edilmiş HA'ya bağlanmakta yetersiz kaldığı düşünülmektedir (66,67).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Demirbaş Malzemeler

1. Laminar air flow
2. Invert mikroskop
3. Işık mikroskop
4. Faz-konsantrasyon mikroskop
5. Vorteks
6. Santrifüj
7. Buzdolabı
8. Otomatik pipet
9. Etüv
10. Inkübatör

3.1.2. Sarf malzemeler

1. ICSI pipet
2. Holding pipet
3. PICSİ dishi

4. Falcon petri kabı
5. Cam pastör pipetleri
6. Falcon konik tüpler
7. Mops (hepes)
8. Fertilizasyon medyumunu
9. Clivaj medyumunu
10. Blastokist medyumunu
11. Ovoil
12. Gradient solüsyonları (%90 ve %50'lik)
13. Pvp

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1 Hasta seçimi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesinde infertilite tanısı olarak tüp bebek uygulamasına alınan infertilite sebebi açıklanamayan 25-35 yaş arası kadın ve normospermiye (20×10^6 /ml ve üstü) sahip erkek çiftlerden oluşmaktadır. Bu çalışma 50 hasta'dan oluşmaktadır. Hastalar tez çalışma projesi hakkında bilgilendirilmiştir.

3.2.2 PICSİ Prosedürü

3.2.2. 1 Oosit ve spermin toplanması ve değerlendirilmesi

a) Oositin toplanması: Tüp bebek tedavisine başlayan hastalara belirli bir ovulasyon indüksiyonundan sonra istenilen büyüklüğe ve sayıya ulaşan foliküllere hcg uygulanır, hcg ile ovulasyon tetiklenir. HCG enjeksiyonundan sonraki 35-38 saatleri arasında OPU yapılır. Aspire edilen sıvı içerisinde bulunan oositler laminar flow içerisinde pipet yardımıyla alınarak ovoil kaplı MOPS (HEPES) medyumunu içerisine aktarılır. OPU işlemi bittikten sonra hepesin içinde temizlenen oositler kültür medyumuna aktarılarak %5CO₂, %5 O₂, %90N₂ içeren inkübatöre kaldırılır. İki saatlik inkübasyondan sonra oositlerin kumulus hücrelerini temizleme işlemi yapılır. Bu işlem kimyasal (hyaz) ve mekanik(farklı büyüklükteki pipet yardımıyla) yolla yapılır. Oosit temizleme

işleminde sonra metafaz 2 safhasındaki olgun oositler eşit sayıda ikiye bölünerek ICSI için inkübatöre kaldırılır.

b) Semen örneğinin alınması ve hazırlanması: OPU günü 2-3 günlük cinsel perhiz sonrası masturbasyon ile alınan semen örneği laboratuvara ulaştıktan sonra 10-30 dak. 37°C 'de likefiye olana kadar bekletilir. Diğer bir tarafta ısınması için farklı konsantrasyonlarda (%90 ve %50) gradient solüsyonu hazırlanır. Falcon konik tüplere alta yoğun olan %90'lik solüsyondan 1 ml,üste az yoğun olan %50 lik solüsyondan 1ml olacak şekilde hazırlanır.Bu solüsyonların ısınmasından sonra likefiye olan ve sayıca değerlendirilen (20 milyon üstü) semen örneğinden 2 ml alınarak (2 gradientin toplamı kadar semen örneği konulur)yavaş bir şekilde gradient solüsyonların üzerine eklenir. Daha sonra 2000 devirde 10 dak santrifüj edilir. Santrifüj sonrası supernatant atılarak pellet üzerine 2ml fertilizasyon medyumunu eklenerek tekrar 2000 devirde 10 dak.santrifüj edilir. İkinci santrifüjden sonra yine üst kısım alınıp atılır, pellete 2-3 damla fertilizasyon medyumunu eklenerek eşit miktarda ikiye bölüp inkübatöre kaldırılır.

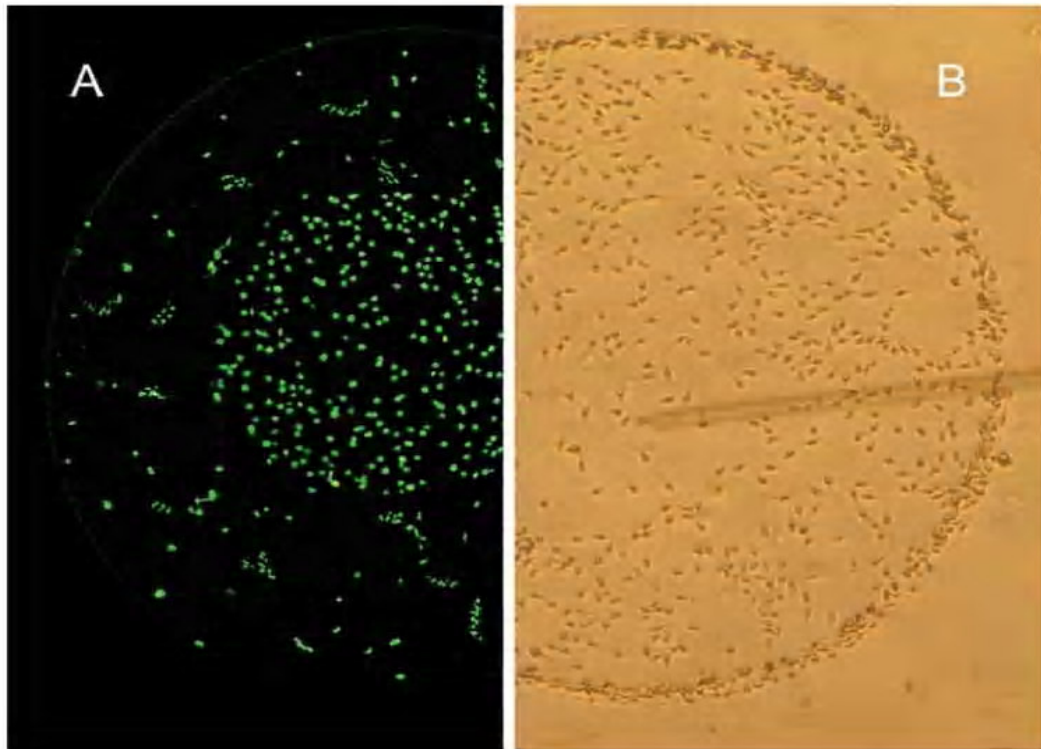
3.2.2.2 PICSİ dishinin hazırlanması

PICSİ dishi tabanın iç kısmına üç mikro nokta halinde hyaluronan eklenmiş plastik bir dishtir. Taban kısmında mikro noktaların yerini belirlemek için kabartma şeklinde üç tane çizgi bulunmaktadır.

Belirleme çizgilerinin ucundaki her mikro noktaya 10- μl damla HTF (Human Tubal Fluid) damlatılır. Aynı anda spermi manipüle etmek için kullanılan PVP'yi dishin diğer kısmına damlatıp kültür yağı ekleyerek kullanıma hazır hale getirilir.

Sperm eklemeyen önce mikro noktaları sulandırmak, hyaluronana kabarması için zaman kazandırır. Kabarma ve sperm bağlanması normal şartlarda 5 dakikada veya daha önce gerçekleşir. Beş dakikalık ısınma süresinden sonra HTF'ye aynı oranda yani 10- μl sperm eklenir ve sonra sulandırma solüsyonu ile derhal karıştırıp ve karışımın mikro noktadan uzaklaşmaması sağlanır. Eğer sperm miktarı sulandırma solüsyonundan az olursa spermlerin solüsyon boyunca yüzüp mikro noktaya ulaşması uzun süre alabilir. Bu süreyi sperm sayısına göre uzatıp kısaltabiliyoruz, maksimum bağlanma gözlemlenmesi için 30 dakika veya daha uzun süre inkübe edilmesi gerekiyor. Sulandırılmış mikro noktalar saatlerce stabil kalırlar. Bir kez bağlandıktan sonra bağlanan spermler kolaylıkla tanımlanabilir. Spermler kuvvetli kuyruk hareketlerine rağmen ilerleyici bir hareket sergileyemezler (Şekil 3.1).

Bağlanmış spermleri toplamak için ICSI mikropipeti spermin yanına getirip ve etrafındaki sıvı ile birlikte pipetin içine çekip, işleme 20-50 sperm yakalayana kadar devam edildi Yakalanan spermler ICSI işlemine hazırlamak (kuyruğun inaktivasyonu, morfoloji ve hareketliğin yeniden değerlendirilmesi) için bir sperm yavaşlatma medyumu olan PVP içine bırakıp buradan spermleri tekrar morfolojik olarak seçmek gerekir.



Şekil 3.1.a) Floresan mikroskobunda PICSI dishi HA bölgesine bağlanan spermler

b) İvert mikroskobunda PICSI dishi HA bölgesine bağlanan spermler

3.2.2.3. Metod

Alınan oosit ve spermler eşit sayıda bölünüp yarısı belirli bir miktarda direk pvp içerisine konularak embriyolog tarafından yüksek büyütmeli mikroskop altında morfolojik olarak en iyi görünen spermi seçerek ICSI işlemi için hazır hale getirip ICSI işlemi yapılır. Diğer yarısı yine belirli bir miktarda PICSI dishinde bulunan özel noktacıklar konulup bu noktacıklara kuvvetli kuyruk hareketi ile baş kısmından bağlanan HA bağlı spermler ICSI pipet yardımıyla alınarak pvp içerisine konulup daha

sonra embriyolog tarafından yüksek büyütmeli mikroskop altında morfolojik olarak tekrar seçilip ICSI için hazır hale getirilir ve ICSI işlemi yapılır. Yapılan bu işlemler arasında embriyo gelişimi ve bunun gebelik üzerine etkisini gözlemledik.






3.2.3.Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi

Embriyoların morfolojileri inverted mikroskop altında aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilmiştir;

- Embriyo blastomer sayısı (hücre sayısı)
- Embriyo blastomer büyüklüğü (blastomerlerin eşit ya da eşit olmaması)
- Fragmentasyon varlığı ve yüzdesi (hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkan çekirdeksiz hücre parçacıkları)

Bu kriterlere göre aşağıdaki embriyo skortlama sistemi kullanılmıştır (S.Kahraman ve ark.2002) (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. 3.gün embriyo skrolama tablosu

<p>GRADE I $8 \leq$ hücre sayısı $< \% 10$ fragmantasyon Blastomer çapları eşit</p>	
<p>GRADE II $8 \leq$ hücre sayısı $\% 10- 20$ fragmantasyon Blastomer çapları eşit</p>	
<p>GRADE III 5- 7 hücre veya $\% 20$ fragmantasyon veya Blastomer çapları eşit değil</p>	
<p>GRADE IV 4- 6 hücre veya daha fazla $> \% 20$ fragmantasyon veya Blastomer çapları eşit değil</p>	
<p>GRADE V ≤ 4 hücre sayısı veya $> \% 50$ fragmantasyon</p>	

Blastokist gradeleme sistemi (Gardner ve ark.)

- 1- Erken blastokist: blastosöl hacmi embriyonun yarısından daha az.
- 2- Blastokist: blastosöl büyük yada embriyonun hacminin yarısına eşittir.
- 3- Dolu blastokist: blastosöl, embriyoyu tamamen doldurur.
- 4- Genişlemiş blastokist: blastosöl hacmi, erken embriyodan daha büyük ve zona pellusida ince.
- 5- Hatching blastokist: trofoektoderm, zona pellusida üzerinden çıkmaya başlamıştır
- 6- Hatched blastokist: blastokist, zona pellusidadan tamamen kurtulmuştur.

Blastokist grade sistemleri altıya ayrıldığı gibi, iç hücre kütlesi ve trofoektoderm gelişimi başka türlüde değerlendirilmiştir.

İç hücre kütlesi (ICM) grade:

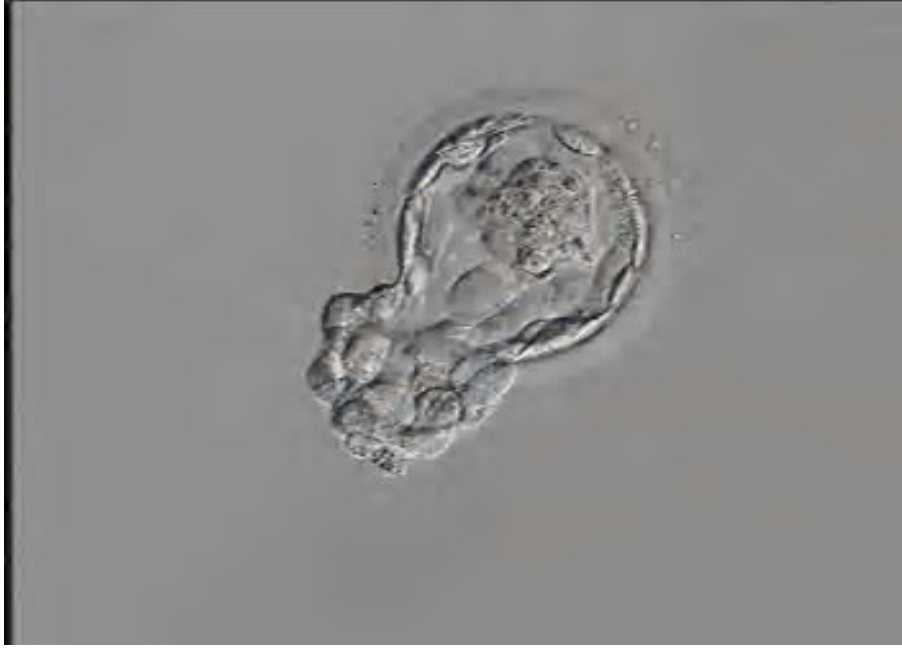
- A- sıkıca sarılmış, çok fazla hücre.
- B- gevşek gruplu, birkaç hücre.
- C- çok az hücre.

Trofoektoderm grade:

- A- bir çok hücrenin bir düzen ile oluşturduğu epitel.
- B- az hücre.
- C- çok az hücrenin oluşturduğu gevşek epitel.



Şekil 3.2 Blastokist



Şekil 3.3: 5 BB-Hatching blastokist



Şekil 3.4: 5BA-Hatching blastokist



Şekil 3.5: 4AA-Genişlemiş blastokist



Şekil 3.6: 1 Erken blastokist



Şekil 3.7: 2CC-Blastokist



Şekil 3.8: 3BB-Dolu blastokist

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İnfertilite sebebi açıklanamayan 25-35 yaş arası kadın ile normozoo (20×10^6 /ml ve üstü) sperme sahip erkeklerden oluşan 50 hastayı içeren bir çalışmadan PICSI dishinde HA bağlı sperm ile yapılan ICSI ile embriyolog tarafından görsel olarak yapılan ICSI arasındaki embriyo kalitesi ve gebelik oranlarının karşılaştırılmasında X^2 testi kullanılmıştır. İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS 15.0 ile yapıldı. $P < 0.05$ olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma infertilite sebebi açıklanamayan 25-35 yaş arası kadın ile normozoo (20×10^6 /ml ve üstü) sperme sahip erkeklerden oluşan 50 hastalık bir çalışmayı kapsamaktadır. PICSİ dishinde HA bağlı sperm ile yapılan ICSI ile embriyolog tarafından görsel olarak yapılan ICSI arasında ki embriyo kalitesi ve gebelik oranları arasındaki farka bakılmıştır.

Toplam 50 hastada yapılan bu çalışmada, 26 hastaya PICSİ yöntemiyle gelişen embriyolar, 24 hastaya da görsel olarak seçilen spermle elde edilen embriyolar transfer edilmiştir. 26 PICSİ hastasından 11 hasta gebe kalmıştır. 24 görsel ICSI'den 9 gebelik elde edilmiştir. Gebelik oranları %42 -%37.5 dir.

PICSİ ve görsel ICSI arasında embriyo kalitesi ve gebelik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($P > 0.05$).

Tablo 4.1 ICSI ve PICSI dışında gelişen embriyo kalitesi ve gebeliklerinin karşılaştırılması

Hasta Sayısı	Hasta Yaşı	Uygulanan Yöntem	Embriyo Morfolojisi	Gebelik
1	32	PICSI	G II	POZİTİF
2	31	ICSI	G II	POZİTİF
3	25	ICSI	BLAST(3BB)	NEGATİF
4	30	PICSI	G II	NEGATİF
5	34	ICSI	G II	NEGATİF
6	31	PICSI	G II	POZİTİF
7	30	PICSI	G III	NEGATİF
8	34	ICSI	G I	NEGATİF
9	33	ICSI	G II	NEGATİF
10	32	PICSI	BLAST (5BA)	POZİTİF
11	25	ICSI	BLAST (3BB)	NEGATİF
12	28	PICSI	BLAST (4BB)	NEGATİF
13	33	ICSI	BLAST (4AA)	POZİTİF
14	29	ICSI	BLAST (4BB)	POZİTİF
15	31	ICSI	BLAST (3BB)	NEGATİF
16	25	ICSI	BLAST (5BA)	NEGATİF
17	34	PICSI	G III	NEGATİF
18	31	PICSI	BLAST (5BA)	POZİTİF
19	28	ICSI	BLAST (3BA)	NEGATİF
20	30	ICSI	BLAST (5BA)	NEGATİF
21	25	ICSI	BLAST (4BA)	POZİTİF
22	31	PICSI	G III	NEGATİF
23	34	PICSI	BLAST (3BB)	NEGATİF
24	33	ICSI	G II	NEGATİF
25	29	PICSI	BLAST (5BA)	NEGATİF

Tablo 4.1 ICSI ve PICSİ dışında gelişen embriyo kalitesi ve gebeliklerinin karşılaştırılması (**Devamı**)

Hasta Sayısı	Hasta Yaşı	Uygulanan Yöntem	Embriyo Morfolojisi	Gebelik
26	31	ICSI	G II	POZİTİF
27	29	ICSI	G III	NEGATİF
28	29	ICSI	G II	NEGATİF
29	30	ICSI	G II	NEGATİF
30	32	ICSI	G II	NEGATİF
31	26	PICSİ	G IV	POZİTİF
32	29	ICSI	G I	POZİTİF
33	28	PICSİ	G I	POZİTİF
34	29	PICSİ	G I	POZİTİF
35	30	PICSİ	G I	NEGATİF
36	32	PICSİ	G I	NEGATİF
37	28	PICSİ	G I	NEGATİF
38	23	PICSİ	G I	NEGATİF
39	32	PICSİ	G II	NEGATİF
40	26	ICSI	G II	POZİTİF
41	33	PICSİ	G III	NEGATİF
42	32	PICSİ	G IV	NEGATİF
43	28	PICSİ	G II	NEGATİF
44	26	ICSI	G II	POZİTİF
45	33	PICSİ	BLAST (4BA)	POZİTİF
46	32	PICSİ	G II	POZİTİF
47	28	ICSI	G II	NEGATİF
48	25	ICSI	BLAST (4BB)	POZİTİF
49	26	PICSİ	BLAST (5BB)	POZİTİF
50	28	PICSİ	G II	POZİTİF



Şekil 4.1: PICSI ile gelişen embriyo G I



Şekil 4.2: Görsel ICSI ile gelişen embriyo G I



Şekil 4.3: PICSI ile seçilen embriyo G II



Şekil 4.4: Görsel ICSI ile seçilen embriyo G II



Şekil 4.5: PICSI ile seçilen embriyo G III



Şekil 4.6: Görsel ICSI ile seçilen embriyo G III



Şekil 4.7: PICSI ile seçilen embriyo G IV



Şekil 4.8: PICSI ile seçilen embriyo BLAST 5BA



Şekil 4.9: Görsel ICSI ile seçilen embriyo BLAST 4BB



Şekil 4.10: PICSI ile seçilen embriyo BLAST (3BB)



Şekil 4.11: Görsel ICSI ile seçilen embriyo BLAST (3BB)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroenjeksiyon tekniğinde labaratuvar şartlarında seçilmiş olan en iyi morfolojiye sahip sperm, yine seçilmiş olgun bir yumurta içine sperm enjekte edilerek fertilizasyon meydana getirilmektedir ve bu ilk oluşuma zigot denilmektedir. Morfolojik özelliğe göre en iyi kalitedeki tek embriyo seçilerek anne rahmine transfer edilmektedir.

En iyi embriyoyu oluşturmak için sperm ve oosit önemli bir faktördür. ICSI için sperm seçiminde morfolojik seçim güvenilir bir metod değildir. Sperm kromozomal anomalileri ve sperm morfolojisi arasındaki tutarsız ilişki; yüksek mikroskopik görüntülemeye dayalı olarak ICSI için sperm seçim uygulamaları ile zıtlık göstermektedir.

Görüntüleme teknikleri ile spermin seçiminde DNA bütünlüğü, histonların varlığı ve sperm kromozomların yapısı aneuploidi üzerine henüz herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Spermatogenez sırasında plazma membranın yeniden şekillenmesi ile düzenlenmekte olan sperm-zona bağlanma alanı ile HA reseptörünün biçimlenme alanının benzer olduğu ve matür spermatozoanın HA alanının seçebilmekte olduğu farz edilmektedir. Spermin zona pellusida da olduğu gibi HA'ya bağlanma bölgesinde baş kısmıdır (57).

Zona pellusida'ya bağlanan spermelerde olduğu gibi Kruger sınıflandırılması sonucu normal olarak değerlendirilen aynı şekilde spermelerin HA'ya bağlanan spermelerle aynı özellikte olduğu saptanmaktadır (58).

Spermatozoa HA bölgesine ilk olarak baş kısmındaki akrozom bölgesiyle bağlanır, akrozom reaksiyonu ve kapasitasyonunun ileri safhasındaki spermatozoa HA bağlanmasını göstermez (59).

HA bağlı matür sperm ile ilgili daha ileri çalışmalar şunu göstermektedir; HA ile seçilmiş spermatozoa geçerli spermatozodur. HA bağlı spermatozoa sitoplazmik defektlerden, sürekli histonlardan, DNA fragmantasyonlarında ve apoptik bir marker olan Caspace-3'den yoksundur. Bu özellikler, nükleer ve sitoplazmik immatürite için oldukça önemlidir. Özellikle DNA fragmantasyonunun varlığı spermin zigota, babaya ait kötü etkileri geçirdiği bilinmektedir (60).

Hyaluronan oositi çevreleyen cumulus oophorus tabakasının ana bileşenlerinden biridir. Olgun bir spermin baş kısmı spermin hyaluronana bağlanmasını sağlayan hyaluronana özel reseptörler barındırır (61). Olgun olmayan spermeler bağlanamazlar. Olgun sperm yüksek DNA bütünlüğü, normal frekans aralığında kromozomal anöploidi sergiler ve zigota, normal döllemede zona pellucida tarafından seçilen sperme eşit oranda babadan gelen özelliklerin iletimini sağlar (62).

Geleneksel ICSI uygulamalarında enjeksiyon için seçilecek sperm görsel olarak morfolojileri ve motiliteleri baz alınarak seçilir. Fakat bu yaklaşım spermin genomik bütünlüğünü ve zigota en iyi kalıtsal özellikleri sağlayacağı anlamına gelmez. PICSİ dish olgun spermelerin hyaluronan hidrajele bağlanma özelliği sayesinde sperm seçiminde etkin bir araçtır. PICSİ; doğal dölleminin önemli bir seçim aşaması olan, spermin cumulus oophorusa bağlanmasını taklit eder.

HA bağlanması ile bu yeni sperm seçim yönteminin gelişimi, spermatogenezis sırasında spermin bağlanma bölgesinin tanınmasına, zona pellusida'ya bağlanmasının plazma membranının yeniden şekillenmesi ile formasyonuna ve HA bağlanma bölgesinin genel olarak düzenlenerek tanınmasına dayalıdır (63-65).

Membranın yeniden şekillenmesinde başarısız olan immatür sperm immobilize edilmiş HA'ya bağlanmakta yetersiz kaldığı düşünülmektedir (66,67).

ICSI için kullanılacak olan spermin in vitro olarak seçimi preimplantasyon öncesi embriyogenez için kritiktir ve direkt etkiye sahiptir (68).

Hyaluronan cumulus matriksinin majör birleşenidir (69).

PICSI dishi in vitro fertilizasyon sırasında fonksiyonel olarak yetkin spermin seçiminde önemli bir rol oynayabilmektedir (70,71).

HA bağlı sperm artmış seviyede gelişimsel olgunluk ve sperm kromatin bütünlüğüne sahiptir. (72).

HA bağlanmış sperm ve fonksiyonel olarak yeterli kalitedeki sperm arasındaki ilişki, ICSI hastalarının tedavisinde son yıllardaki çalışmalarda araştırılmaktadır (73).

Aziz ve arkadaşları 2006 yılında fertilité tedavisine optimize etmek için erkek infertilitesi ve sperm fonksiyonunun objektif olarak değerlendirilmesine sperm HA bağlanma deneyinin katkıda bulunacağını öngörmektedir (74).

Sperm hemizona deneyine göre sperm HA testi daha hedefe yöneliktir. Çünkü fertilize olmamış insan oositlerinin bütünlüğündeki çeşitliliğe karşılık olarak HA slaytları aynı kaliteye sahiptir (74).

Sanchez ve arkadaşları, 2005 ESHRE presantasyonunda 18 gebelikle ilgili bir data rapor etmişlerdir. ICSI için görsel olarak seçilmiş spermatozoa ile (n=84), HA bağlanmış sperm (n=18)'in fertilizasyon oranları %69.7 %67.0 ; iyi kalitedeki embriyo %56.6 %51.7 ; gebelik oranları %45.3 %33.0 ; düşük oranları %7 %0 ; eve bebek götürme oranları % 46.5 % 39.0 olarak gözlemlenmiştir (75).

WorriLOW ve arkadaşları 2006 yılında 26 hasta ile (273 oositten ICSI ile 177 embriyo) bir çalışma yapmışlardır. HA ile görsel olarak seçilmiş spermin fertilizasyon oranları benzerdir. ET yapılan 22 çift arasından 8 çift görsel olarak seçilmiş sperm ile ET yapılmış, 8 çifte HA bağlanmış sperm ile ET yapılmış, diğer 7 çifte ise her iki yöntemle gelişen embriyolar transfer edilmiş. Gebelik oranları % 25.0 , % 57.1 , % 57.1 . Yani iki grupta gebelik oranının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Düşük oranları görsel olarak seçilmiş spermlerde daha yüksektir (P=0.013)(76).

Jonssens ve arkadaşları tarafından 2006 yılında 20 hastayı içeren bir çalışmada en az 8M2 elde edilmiş kardeş oositlere HA-bağlı ve görsel olarak seçilmiş spermler enjekte edilmiştir (n=146,145).

Fertilizasyon oranı %72,9 %66,9 oosit dejenerasyon oranları %9,6 %13,8 ; embriyo clivaj oranları (hücre bölünmesi) embriyo kalitesi ET ve cryopreservasyon oranları benzer olduğu gözlenmiş (77).

Jonsens ve arkadaşları şunu öngörmektedir; ICSI'deki sperm seçimini kolaylaştırmak için HA bağlı sperm kullanılması sperm seçim teknikleri ile ilgili olabilecek embriyonun kromozal durumuna etki edebilecek PGD uygulanacak hastalar için HA bağlı sperm faydalı olabilir (77).

Park ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışma ile ICSI başarı oranlarının ; HA bağlanma oranları ile erken embriyonik mortalite (ölüm) azalması ve kromozomol olarak normal embriyonun üretilmesi ile HA bağlı sperm seçiminin görsel olarak seçilen spermden daha üstün olduğu gözlemlenmiştir (78).

Parmegiani ve arkadaşlarının 2010 yılında İtalya'da yaptığı bir çalışmada İtalya IVF kurallarına göre hasta başına sınırlı sayıda (1-3 adet) ICSI yapılmıştır.

HA bağlanmış sperm ile 293 hasta 331 ICSI yapılmış görsel olarak seçilmiş sperm ile 86 hasta 97 ICSI yapılmış. HA bağlı spermler ile yapılan ICSI grubunda en iyi kalitedeki (Grade I) embriyo oranı önemli oranda yüksek bulunmuştur (%35,2 P=0,011). Görsel sperm grubunda ise %22,3 implantasyo oranı önemli oranda HA grubunda yüksek olarak bulundu. HA-ICSI (%17,1 - %10,3 P=0,047).

Gerçi bu farklılıklar istatistiksel olarak önemli olmasa da transfer başına gebelik oranı daha yüksek görülmektedir (%32,8 - %21,6) (79).

Sonuç olarak, HA'nın sperm seçim özellikleri IVF'de ki zona pellusida'nın seçimi ile aynıdır. Olgun spermatazoo seçiminde HA bağlanma testinin gücü geçerli olmakla birlikte apoptosiz ve sürekli histonlardan yoksundur.

HA bağlı olgun sperm DNA fragmantasyonu göstermemektedir. Bu spermatozoanın paternal etkisini ve erken gebelik kayıplarını azaltarak gebeliğe ulaşmaktaki ICSI etkinliğini geliştirmektedir.

Bizim çalışmamızda infertilite sebebi açıklanamayan 25-35 yaş arası kadın ile normozoo (20×10^6 /ml ve üstü) spermiye sahip erkeklerden oluşan 50 hastalık bir çalışmayı kapsamaktadır. HA bağlı sperm ile yapılan ICSI ile görsel olarak yapılan ICSI arasındaki embriyo kalitesi ve gebelik oranları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. HA bağlı (n=26) ve görsel olarak seçilmiş sperm ile ICSI işlemi gören vakaların (n=24) gebelik oranları %42 ve %37,5'dir ($p=0.395$).

Bu konuda kesin bir kanaate varabilmek için çok merkezli, daha fazla sayıda hasta içeren metaanaliz çalışmalarına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon İndüksiyonu. I. Baskı.2000; 122-155.
2. Şahmay S, Atasu T, İnfertilite. Jinekoloji. Nobel Kitabevi. 2.baskı. 2000; 460-479.
3. Speroff L, Fritz MA. Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite (eds), Erk A, Günalp S. 7. baskı. 2007; 478-816.
4. Kışnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, et al. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ed. Güneş Yayınları, 1996; 1287-1288.
5. Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis LM, Liu HC, Jones GS, Rosenwaks Z. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. Fertil Steril, 1988; 50: 298-305.
6. Sung I Roh MD, William G Doods MD, Jong M Park MD, Sherif G Awadalla MD, Chad I Friedman MD et al: In vitro fertilization with concurrent pelvic reconstructive surgery. Fertil Steril, 1988; 49: 96-99.
7. Veeck L. Oocyte assessment and biological performance. Ann NY Acad Sci, 1988; 541: 259-274.
8. Frederickson B. and Bjork R. Morphology of postcoital sper matozoa in the cervical secretion and its clinical significance. Fertil Steril, 1977; 28: 841-5.

9. Mortimer D, Leslie EE, Kelly RW, Templeton AA. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*, 1982; 64: 391-9.
10. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJVW, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*, 1990; 5: 586-92.
11. Liu DY, Baker HWG. Morphology of spermatozoa that bound to the human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil*, 1992; 94: 71-84.
12. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1986; 46: 1118-1123.
13. Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC. Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Hum Reprod*, 1991; 6: 854-858.
14. Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC. Male factor as determinant of in-vitro fertilization outcome. *Hum Reprod*, 1992; 7: 1136-1140.
15. Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC. Comparison between the hypoosmotic swelling test and the morphology using strict criteria in predicting in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Genet*, 1992; 9: 259-264.
16. Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC. Predictive value of morphologically normal sperm concentration in the medium for in vitro fertilization. *Int J Androl*, 1993; 16: 113-120.
17. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1988; 49: 112-17.
18. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 1995; 64: 982-986.
19. Nagy ZP, Liu J, Joris M, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The results of intra cytoplasmic sperm injection is not related to any of three basic sperm parameters. *Hum Reprod*, 1995; 10: 1123-1129.
20. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Special applications of intra cytoplasmic sperm injection: The influence of sperm count, motility, morphology source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod*, 1988; 13 suppl 1: 143-154.

21. Svalander P, Jakobsson AH, Forseberg AS, Bengtsson AC, Wikland M. The outcome of the cytoplasmic sperm injection is unrelated to strict criteria sperm morphology. *Hum Reprod*, 1996; 11: 1019-1022.
22. Kupker W, Schulze W, Diedrich K. Ultrastructure of gamete and intracytoplasmic sperm injection: The significance of sperm morphology. *Hum Reprod*, 1998; 13 (suppl 1): 99-106.
23. 'Oehninger S, Chaturvedi S, Toner J, Morshedi M, Mayer J, Lanzendorf S, Muasher S. Semen quality: Is there paternal effect on pregnancy outcome in in vitro fertilization/intra cytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998; 13: 2161-2164
24. Van Steirteghem AC, Nagy ZP, Joris H, Liu J, Stassen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm Injection. *Hum Reprod* 1993; 8: 1061-1066.
25. Nikolettos N, Kupker W, Demirel C et al. Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Hum Reprod* 1999; 14 (suppl 1): 47-70.
26. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K, Sozen E, Can B, Guven C, Van der Zwalmen P. Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1999; 14: 726-730.
27. Wong PC, Balmaceda JP, Blanco JD, Gibbs RS, Asch RH. Sperm washing and swim up techniques using antibiotics remove microbes from human semen. *Fertil Steril*, 1986; 45: 97-100.
28. Perrone D, Testart J. Use of bovine serum albumine column to improve sperm selection for human in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1985; 44: 839-841.
29. Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryos invitro. *Am J Obstet Gynecol*, 1981; 141: 408-416.
30. Paulson JD, Polakoski KL. A glasswool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril*, 1977; 28: 178-181.
31. Berger T, Marrs RP, Moyer DI. Comparison of techniques for selection of motile human spermatozoa. *Fertil Steril*, 1985; 43: 268- 273.
32. Gellert- Mortimer ST, Clarke BN, Bkaer HW, Hayne RV, Johnston W. Evaluation of nycodenz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa. *Fertil Steril*, 1988; 49: 235-241.
33. WHO, laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions: Cambridge University Press, Cambridge 4th edition, pp 1999; 60-61.

34. Baker HWG, Ng FLH, Liu DY. Preparation and analysis of semen for ivf/gift. In Trounson A, Gardner DK Handbook of in Vitro Fertilization, CRC Press 1993, USA, pages 33-56.
35. Enginsu ME, Pieters MH, Dumolin JC, Evers JL, Geraedts JP. Male factor as determinant of in vitro fertilization outcome. Hum Reprod, 1992; 7: 1136-1140.
36. Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. Reprod Fertil Dev, 1994; 6: 25-31.
37. Cohenj, Mailer H, Fehilly C, et al. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. Lancet 1988; 2: 162-9.
38. Cohen J, Marker H, Wright G, et al. Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. Hum. Reprod, 1989; 4: 435-38.
39. Laws-King A, Trounson A, Trounson A, Sathananthan H, et al. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. Fertil Steril, 1987; 48: 637-42.
40. Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Induction of acrosome reaction in human spermatozoa used for subzonal insemination. Hum Reprod, 1992; 7: 248-53.
41. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, et al. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. Fertil Steril, 1988; 49: 835-8.
42. Iritani A. Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. Mol Reprod Dev, 1991; 28: 199-206.
43. Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril, 1993; 5: 826-7.
44. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm. Hum Reprod, 1993; 8: 1061-8.
45. Robert D Vincent JR, MD: In vitro fertilization and other assisted reproductive techniques. In David H. Chestnut (eds): Obstetric anesthesia Mosby Inc. 1999; 249-262.
46. Scott L. Analysis of fertilization. In: Textbook of Assisted Reproduction Techniques. Gardner DK, Weismann A, Howless CM, Shoham Z. Edited by Martin Dunitz Ltd, London, UK, 1st ed. pp.2002; 193-201.

47. Çolgar U, Öçal P, Çepni P. In vitro fertilizasyon ve embriyo transferi. Erdoğan Ertüngealp. Meta Basım Yayım, İstanbul, 1995; 178-186.
48. Schoolcraft W B. Embryo Transfers. Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives Edited by: David K. Gardner, Colin M, Howless, A. Weisman, Z. Shoham, Martin Dunitz Ltd. London UK, pp.2002; 623-627.
49. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. Hum Reprod, 1997; 12: 1531-6.
50. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van De Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single embryo transfer. Hum Reprod, 1999; 14: 2345-9.
51. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum Reprod, 1997; 12: 1545-9.
52. Roseboom TJ, Vermedien JP, Schoute E, Lens JW, Schats R. The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. Hum Reprod, 1995; 10: 3035-41.
53. Hartshorne G. The embryo. Hum Reprod, 2000; 4: 31-41.
54. Rienzi L, Ubaldi F, Minasi MG, Lacobelli M, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Blastomere cytoplasmic granularity is unrelated to developmental potential of day 3 human embryos. J Assist Reprod Genet, 2003; 20: 314-7.
55. Huszar, G., et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. Fertil Steril. 2003; 79: 1616-24.
56. Jakab, A. et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency for chromosomal aneuploidies. Fertil Steril, 2005; 84: 1665-73.
57. Cherr GN, Yudin AI, Li MW et al. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. Zygote 7, 1999; 211-222.
58. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. Fertility and Sterility, 1986; 46: 1118-1123.

59. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S *et al.* 2003 Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility*, 2003; 79: 1616–1624.
60. Huszar G, Gordon EL, Irvine DS, Aitken RJ 1998a Absence of DNA cleavage in mature human sperm selected by their surface membrane receptors. *Annual Meeting of the American Society for Reproduction Medicine*, San Francisco, CA.
61. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17–8.
62. Simpson JL, Lamb DJ. Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. *Semin Reprod Med*, 2001; 19: 239–49.
63. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*, 2002; 17: 2600–14.
64. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002; 346: 725–30.
65. Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril*, 1994; 61: 136–42.
66. Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril*, 1990; 54: 1127–34.
67. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/ thawed human spermatozoa. *Hum Reprod*, 1997; 12: 1949–54.
68. Kornovski BS, McCoshen J, Kredentser J, Turley E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril*, 1994; 61: 935–940.
69. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*, 2003; 79(Suppl3): 1616–24.

70. In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, Pearson PL, Pieters MH, van Kooij RJ. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod*, 1997; 12: 752–4.
71. Bartoov B, Berovitz A, Eltes F. Selection of sperm with normal nuclei to improve pregnancy rates with ICSI [letter]. *N Engl J Med* 2001; 345: 1067–8.
72. Lathi RB, Milki AA. Rate of aneuploidy in miscarriages following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2004; 81: 1270–2.
73. K.C. Worrilow, H.T. Huynh, J.B. Bower, A.R. Anderson, W. Schillings and J.L. Crain. PICSI™ vs. ICSI: statistically significant improvement in clinical outcomes in 240 in vitro fertilization (IVF) patients. *Fertility and Sterility*. Volume 88, Supplement 1, September 2007, Page S37
74. Aziz N, Agarwal A, Nallela K, Thomas A Relationship between epidemiological features and aetiology of male infertility as diagnosed by a comprehensive infertility service provider. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006; 12: 209–214.
75. Sanchez M, Aran B, Blanco J et al. 2005 Preliminary clinical and FISH results on hyaluronic acid sperm selection to improve ICSI. Abstracts of the 21st Annual Meeting of the ESHRE, Copenhagen, Denmark 2005. P–556.
76. Worrilow KC, Huynh HT, Bower JB *et al.* 2006 The clinical impact associated with the use of PICSI-derived embryos. Abstracts of the Scientific Oral and Poster Sessions, 62nd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, New Orleans, LA. *Fertility and Sterility* **86** (suppl. 2), O–146.
77. Janssens R, Verheyen G, Bocken G et al. 2006 Use of PICSI dishes for sperm selection in clinical ICSI practice: results of a pilot study. Abstract, 2006 Annual Meeting of the Belgian Society Reproductive Medicine.
78. Park CY, Uhm SJ, Song SJ et al. Increase of ICSI efficiency with hyaluronic acid binding sperm for low aneuploidy frequency in pig. *Theriogenology* 2005; 64: 1158–1169.
79. Parmegiani L. et al. *J Assist Reprod Genet* (2010) 27: 13-16 DOI 10.1007/s10815-009-9380-0

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2010/106	Karar Tarihi : 16.09.2010
	Fakültemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Birkan Yakan'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik değerlendirme komisyonu üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ**ÇALIŞMA ESASI**

ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Halit MADENOĞLU	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. H.Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet Güngör KAYA	Kardiyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Öğr. Gör. Dr. Ferhan ELMALI	Tıp Bilimi ve Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Ecz. Nuran YOZGAT	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Sevtap KOÇER	Sivil Toplum Tems.		E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	



E.Ü. TIP FAKÜLTESİ ETİK BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Komisyonu
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	PICSİ dışı ile seçilen sperm ile elde edilen embriyoların kalitesi ve bunun gebelik oranı üzerine etkisi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Birkan Yakan			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI				
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Değerlendirme Komisyonu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
	UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ	<input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI	<input type="checkbox"/>

ARAŞTIRMA FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>	
	BE/BY	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER	<input type="checkbox"/>	Diğer ise belirtiniz
	ILAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	<input type="checkbox"/>	Belirtiniz

ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ	<input checked="" type="checkbox"/>	ÇOKMERKEZ	<input type="checkbox"/>	ULUSAL	<input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI	<input type="checkbox"/>
-------------------------------	-----------	-------------------------------------	-----------	--------------------------	--------	--------------------------	--------------	--------------------------

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe	<input type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe	<input type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe	<input type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe	<input type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	
	SİGORTA	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	
	İLAN	
	YILLIK BİLDİRİM	
	SONUÇ RAPORU	
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	
DİĞER		

ASLI GİBİDİR



Fakülte Şefi

KATILIMCI BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Katılımcının
Adı, Soyadı, Adresi :

Varsa protokol ve Tel. No :

BİLGİLENDİRME:

PICSI dishi hyalüranik asit(HA) içeren özel noktacıları bulunan bir kaptır. Normal döllenme sırasında yumurtanın etrafında yani corona radiata tabakasında hyalüranik asit bulunur ve döllenmek için hyalüranaz enzimi içeren sperm gelir yumurtanın bu bölgesine bağlanır.Bağlanmayan spermilerin azalmış hareketliliğe ve artmış genetik anormallığe sahip oldukları düşünülmektedir.Bu klinik çalışmanın amacı hyalüranaz enzimi içeren spermilerin PICSI dishinde hyalanüranik asit içeren bölgeye bağlanması ve bu bölgeden seçilen sperm ile embriyolog tarafından morfolojik olarak en iyi kalitede seçilen spermilerin embriyo gelişimi ve gebelik oranları üzerine etkilerini karşılaştırmaktır.

PICSI dishi'nin in vitro fertilizasyon sırasında fonksiyonel olarak yetkin sperm seçiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda , tüp bebek hastalarının tedavisinde HA bağlanmış sperm ve fonksiyonel olarak yeterli kalitedeki sperm arasındaki ilişki araştırılmaktadır.

Tüp bebek uygulamalarında embriyolar 2.-6. günler arasında seçilerek anne adayına transfer edilmektedir. Genellikle, görünümüne (morfoloji) göre en iyi kalitede tek embriyo diğerleri arasından seçilerek transfer edilmektedir.

Bu proje 50 çift içeren bir araştırma grubunu kapsamaktadır.
Bu projenin süresi 1 yıldır.

Siz bir araştırma projesine katılıyorsunuz. Çalışmaya katılmakta tamamen özgürsünüz. Bu çalışma için sizden toplanılan olgun (metafaz II) yumurta ve eşinizden alınan sperm örnekleri kullanılacaktır . Başka bir masrafa gerek yoktur. Sizden başka herhangi bir şey talep edilmeyecektir.Toplanan yumurtalar (oosit) ve eşinizden alınan sperm örnekleri eşit iki parçaya bölünerek bir kısmı geleneksel olarak yapılan embriyolog tarafından morfolojik olarak seçilen en iyi kalitedeki spermlerle intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu(ICSI) yapılacak, diğer kısım ile de önceden PICSI dishinde HA-bağlı bölgeye yapışan sperm alınıp dış görünüşlerine göre yeniden seçilerek ICSI işlemi yapılacaktır. Bu işlemlerin her ikisinde de bütün aşamalar aynıdır.PICSI dishinde HA-bağlı sperm de yine embriyolog tarafından morfolojisine bakılarak seçilecektir.Bu proje yumurta,sperm ve embriyolarınızı hiç bir şekilde olumsuz yönde etkilemeyecektir.Bu araştırma sonucunda morfolojik olarak seçilen en iyi kalitedeki embriyo transfer edilecektir.

Fakültemiz Etik Kurulu bu çalışmanın Helsinki Deklerasyonu'nda belirtilen maddelere göre ahlaki, vicdani ve tıbbi kurallara uygun olduğunu onaylamış olup çalışma denetime açıktır.

Çalışma öncesinde bu tıbbi uygulama ile ilgili tedaviyi istediğinize dair bir evrak imzalamanız gerekmektedir.

Bu çalışmaya katılmakta özgürsünüz. Başlangıçta kabul edip daha sonra fikir değiştirip, hiçbir gerekçe göstermeden çalışmadan ayrılabilirsiniz. Bu durumda sizinle ilgili tıbbi özende bir değişiklik olmayacaktır.

KATILIMCI ONAMI

Aşağıda imzası bulunan ben, "PICSİ dışı ile seçilen sperm ile elde edilen embriyoların kalitesi ve bunun gebelik oranı üzerine etkisi" adlı tıbbi uygulamayla yapılması planlanan, klinik çalışma hakkında, Prof. Dr. Birkan YAKAN' dan tam olarak bilgi aldığımı beyan ederim. Bu tıbbi uygulamanın etik açıdan Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun kurallarına uygun olarak incelendiğini ve planlanan yöntemin insanlara uygulanmasının sakıncalı olmayacağı bana anlatıldı. Ayrıca bana, bu çalışmanın tıbbi olarak geçerli olduğu ve en son bilimsel yöntemlere uygun olarak yapılacağı bildirildi.

Bunun, denetime açık bir çalışma olduğu bana anlatıldı.

Beni muayene eden doktora, daha önceki ve şu andaki tüm hastalıklarımı ve şu anda uygulanan tedaviyi bildirdiğimi teyid ederim. Son dört haftada herhangi bir çalışmada yer almadım.

Aşağıda imzası bulunan doktordan bu bilgileri aldıktan sonra ben, yapılması planlanan çalışmanın özelliklerini ve sonuçlarını anlıyorum. Bana verilen bu bilgiler temelinde, istediğim herhangi bir zaman, hiçbir sakınca olmadan, çalışmadan çekilebileceğimi teyid ediyorum.

Araştırma sonuçlarının eğitim ya da bilimsel amaçlarla kullanılması sırasında mahremiyetime saygı gösterileceğine inanıyorum. Bu şartlar altında söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih: **Katılımcılar** **Kuruluş Görevlisi Tanık**

Bilgilendirmeyi yapan **Adı, Soyadı** **Adı, Soyadı** **Adı, Soyadı**

Dr. Adı, Soyadı

Prof. Dr. Birkan YAKAN

İmza: **İmza:** **İmza:** **İmza:**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Esin SIDAR YALÇINOĞLU
Uyruğu: Türkiye (T.C.)
Doğum Tarihi ve Yeri: 1983-KAYSERİ
Medeni Durumu: Evli
Tel: +90 530 222 17 47
email:esinyalcınoglu@gmail.com

Yazışma Adresi: Bahçelievler Mah. Efekent Sit. C- Blok B-Giriş 11-22 Talas KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	-
Lisans	Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Melikgazi Lisesi Kayseri	2000

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2007- 2011	Erciyes Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi	Embriyolog
2011	Kayseri Tüp Bebek Merkezi	Embriyolog

YABANCI DİL

İngilizce