

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**FARKLI SPERM KAYNAĞINA BAĞLI OLARAK İCSI UYGULAMASI
SONUÇLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE ÇELİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. TÜLAY İREZ

İSTANBUL
TEMMUZ 2018

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 31/07/2018

Prof. Dr. İmer OKAR
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Meriç KARACAN
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Üye

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÖNSÖZ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite	3
2.2. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri	4
2.3. Spermatogenez	5
2.4. Normal Semen Parametreleri	6
2.5. Semen Genel Olarak İncelenmesi	8
2.5.1. Semende Renk Ve Koku	8
2.5.2. Semen Görünüm Ve Koagülasyonu	8
2.5.3. Semen Volümü	8
2.5.4. Semende Likefaksiyon (Çözülme)	8
2.5.5. Semende Ph	9
2.5.6. Sperm Hareketliliği (Motilite).....	10
2.6. SEMEN ANALİZİ VE SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ.....	10
2.6.1. Yıkama Ve Doğrudan Yüzdürme Metodu	11
2.6.2. Yoğunluk Sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi.....	11
2.6.3. Sperm Dansitesi/Konsantrasyonu Ölçümü; Hemositometrik Yöntem	12
2.6.4. Sperm Konsantrasyonunun Makler Sayma Kamarası İle Ölçümü	13

2.6.5. Kruger Kriterlerine Dayalı Morfolojik(Şekilsel) Değerlendirme.....	13
2.7. İn Vitro Embriyo Gelişimi	14
2.8. Azoospermi.....	16
2.9. Mesa Yöntemi:	17
2.10. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (İcsı).....	17
3. GEREÇ YÖNTEM	18
4. BULGULAR	20
5. TARTIŞMA.....	23
6. SONUÇ.....	27
7. ÖZET	28
8. SUMMARY	29
9. KAYNAKLAR.....	30
10. EKLER.....	30
11. ÖZGEÇMİŞ	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Neubauer Kamarasında Sayma Alanları.....	13
Şekil 2. Makler Sayma Kamarası.....	13
Şekil 3. Kruger Morfolojik Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi Değerlendirilmesi	14



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Erkek İnfertilitesinde Etyoloji.....	3
Tablo 2. Spermatogonez'in Aşamaları.....	5
Tablo 3. Semen Analizi Normal Değerleri (WHO'ya göre).....	6
Tablo 4. Semen Sıvısının Kaynakları ve Katkı Miktarları	8
Tablo 5. Bölünme Evresinde Embriyo Sınıflaması	13
Tablo 6. Günde Embriyo Gelişiminin Sınıflandırılması	14
Tablo 7. Canlı Doğum ile Negatif Gebelik Karşılaştırması	19
Tablo 8. TESE Olgularında Canlı Doğum ile Sonuçlanan Gebelik ve Gebe Olmayan Grup Karşılaştırması.....	20
Tablo 9. Mikro TESE Olgularında Canlı Doğum ile Sonuçlanan Gebelik ve Gebe Olmayan Grup Karşılaştırması	20
Tablo 10. Ejakülat Spermi Olgularında Canlı Doğum ile Sonuçlanan Gebelik ve Gebe Olmayan Grup Karşılaştırması.....	21
Tablo 11. TESE Olgularında Embriyo Parametreleri.....	21
Tablo 12. Mikro TESE Olgularında Embriyo Parametreleri.....	22
Tablo 13. Ejakülat Spermi Olgularında Embriyo Parametreleri.....	23

KISALTMALAR DİZİNİ

ES: Epididimal Sperm

FSH: Follicle Stimulating Hormone(Folikül Uyarıcı Hormon)

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone(Gonadotropin Salgılatıcı Hormon)

hCG: Human Chorionic Gonadotropin Hormone (İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu)

HTF: Human Tubal Fluid

ICSI: Intra Cytoplasmic Sperm Injection (İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

IUI: Intra Uterin İnsemination (İntra Uterin İnseminasyonu)

IVF: In Vitro Fertilization (İn Vitro Fertilizasyon)

IVF-ET: In Vitro Fertilization-Embryo Transfer (İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi)

LH: Luteinizing Hormone (Lütein Hormonu)

MAR-TESTİ: Sperm Otoantikör Testi

MESA: Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu

NOA: Non Obstrüktif Azoospermi

OA: Obstrüktif Azoospermi

PCO: Polycystic Ovary Syndrome (Polikistik Over Sendromu)

Rpm: Devir/Saniye

TESE: Testicular Sperm Extraction (Testisten Sperm Ekstraksiyonu)

TS: Testiküler Sperm

WHO: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

μ: Mikro

°C: Santigrat Derece

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı özenle takip eden ve çok büyük emek gösteren bana bu süre zarfında destek ve imkânlarını esirgemeyen sevgili danışmanım **Prof. Dr. Tülay İrez'** e sonsuz teşekkür ederim.

Tezimde engin bilgilerini benimle paylaşan ve yol gösteren **Prof. Dr. İmer Okar** Hocam'a ve bu süreçte bize yardımını esirgemeyen, tez çalışmam için her konuda bana destek veren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan **Doç. Dr. Meriç Karacan** Hocam'a teşekkür ederim.

Doğduğum günden beri hayatım boyunca benden sevgilerini esirgemeyen, her konuda destek veren, sabırla ve sevgiyle yanımda olan maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen annem **Güner Erdem'e** ve babam **İbrahim Halit Çelik'e** sonsuz teşekkür ederim.

Arkadaşlık ve kardeşlik kavramını bana yaşatan, her anımda yanımda olan, bana desteklerini esirgemeyen ağabeyim **Fırat Erdem**, yengem **Tuğba Erdem** ve ablam **Esra Canpolat'a** teşekkür ederim.

Okulun bana kazandırdığı daimi arkadaşım, kardeşim, tez arkadaşım her anımda yanımda ve destek olduğu için **Hatice Topkara'ya**, her zaman her konuda bana destek veren kardeşim **Tuğçe Arslan'a** tez aşamasında bana destek olduğu için canım arkadaşım **Esra Aydın' a**, her zaman yanımda olan canım arkadaşım **Neslinur Özçelik'e** ve tez sürecim boyunca manevi olarak destek veren, hayatımı kolaylaştıran **Selçuk Öztürk'e** teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanılmamasına rağmen üreme yeteneğine sahip bir eş varlığında en fazla 12 ayın sonunda çocuk sahibi olamama veya gebelik meydana gelmemesi infertilite olarak tanımlanmaktadır.¹ Oranı sürekli artış gösteren infertilitenin %30 oranında erkek kaynaklı olduğu belirtilmektedir.² Dolayısı ile erkek infertilitesinin nedenleri ile altta yatan sebepler ayrıntılı bir şekilde araştırılmaktadır. Erkek infertilitesi değerlendirilirken tam bir fiziki muayene, hasta öyküsü ayrıntıları ile alınırken aynı zamanda semen analizleri ile görüntüleme ve laboratuvar testleri de yapılmaktadır.³

İnfertilitenin erkek kaynaklı olduğu çalışmalarda temel sperm parametrelerinin büyük önem arz ettiği özellikle düşük sperm hareketliliğinin (Astenozoopermi) erkek infertilitesinin başlıca nedeni olduğu ifade edilmektedir. Çünkü Astenozoopermi'ye eşlik eden diğer anormal sperm parametreleri, infertilitenin daha şiddetli olmasına neden olabilmektedir.⁴

Modern tıbbın gelişmesi ile birlikte İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyon (ICSI) gibi yardımcı üreme teknikleri ile doğal uygulamada oluşamayan fertilizasyonun gerçekleşmesi sağlanabilmektedir. ICSI uygulamasında Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) veya Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu (MESA) tekniği ile elde edilen spermiler ile kabul edilebilir düzeyde embriyo gelişimi ve fertilizasyon ile beraber sağlıklı gebeliklerin meydana gelmesine yardımcı olunmaktadır.⁵

ICSI uygulaması ile İn Vitro Fertilizasyonda embriyo gelişiminin değerlendirilmesi için belli aralıklar ile zigot değerlendirmesi, bölünme hızı, pH değişiklikleri ve sıcaklık kontrolleri yapılarak embriyonun sağlıklı bir şekilde gelişimi ve transferinin yapılabilmesi sağlanmaktadır.⁶

Çalışmamızın amacı, sperm kaynağı farklı olan, ejakülat spermi, Tese ve Mikro TESE olgularında intra stoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemi kullanarak embriyo gelişimi, gebelik ve canlı doğum oranları retrospektif olarak değerlendirilmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Infertilite

Fertil olmayan anlamına gelen infertilite 'sterilite' ile aynı anlam taşımaktadır. Kelime anlamı ile infertilite; çiftin bir yıldan daha fazla süre korumasız ancak düzenli ilişki yaşamalarına rağmen gebe kalınmaması durumu olarak tanımlanmaktadır.⁷

Tıbbi olarak bir hastalık olan infertilite; herhangi bir tedavi ve araştırma yapmadan önce gebelik istenildiği hâlde gebe kalınamayan süre, medikal öykü, fiziksel bulgular ve değerlendirmeler eksiksiz bir şekilde incelenmelidir. İlişkinin zamanlaması, süresi ve sıklığı gebeliğin meydana gelme olasılığını etkilemektedir. Çünkü gebeliğin oluşması sadece erkeğe bağlı bir durum değildir. Kadının fizyolojik ve ruhsal durumu da gebeliğin meydana gelme olasılığını etkileyebilmektedir.⁸

İnfertilitenin tarihi eski antik Yunana kadar uzanmaktadır. Bilimsel olarak ilk defa Hipokrat tarafından tanımlandığı ve kadın kaynaklı olabileceği de ifade edilmiştir. Belçikalı fizikçi ve anatomist olan Andreas Vesalius ise tarihte kadın üreme sistemini tam ve eksiksiz bir şekilde ortaya koyan ilk bilim insanıdır. Amerikan jinekolojisinin babası olan Marion Sims ise genital traktusta servikal sekresyonların spermin yaşama şansına olan etkisini ortaya koymuştur. 1980'li yıllarda ise infertilitenin medikal olarak nasıl tedavi edilmesini gerektiği ve ovulatuvar bozukluklar üzerine yoğunlaşmıştır.⁹

Sağlıklı bir gebeliğin meydana gelebilmesi için sağlıklı oosit üretimi, sağlıklı sperm üretimi, oosit ve sperm üretimi, embriyonun uterusu taşınması ve aksaksız bir şekilde endometriyum implantasyonu gerekmektedir. Bu faktörlerden herhangi birinin olmaması durumunda gebelik meydana gelmemektedir.¹⁰

2.2. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

Çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin değerlendirilmesinde kadına yönelik invazif testlere başlamadan önce erkeğin değerlendirilmesi yapılmalıdır (Tablo 1).

Erkek; fizik muayene, sperm analizi, genetik ve endokrin testler yapılarak araştırılmalıdır.¹¹

Tablo 1. Erkek İnfertilitesinde Etiyoloji¹¹

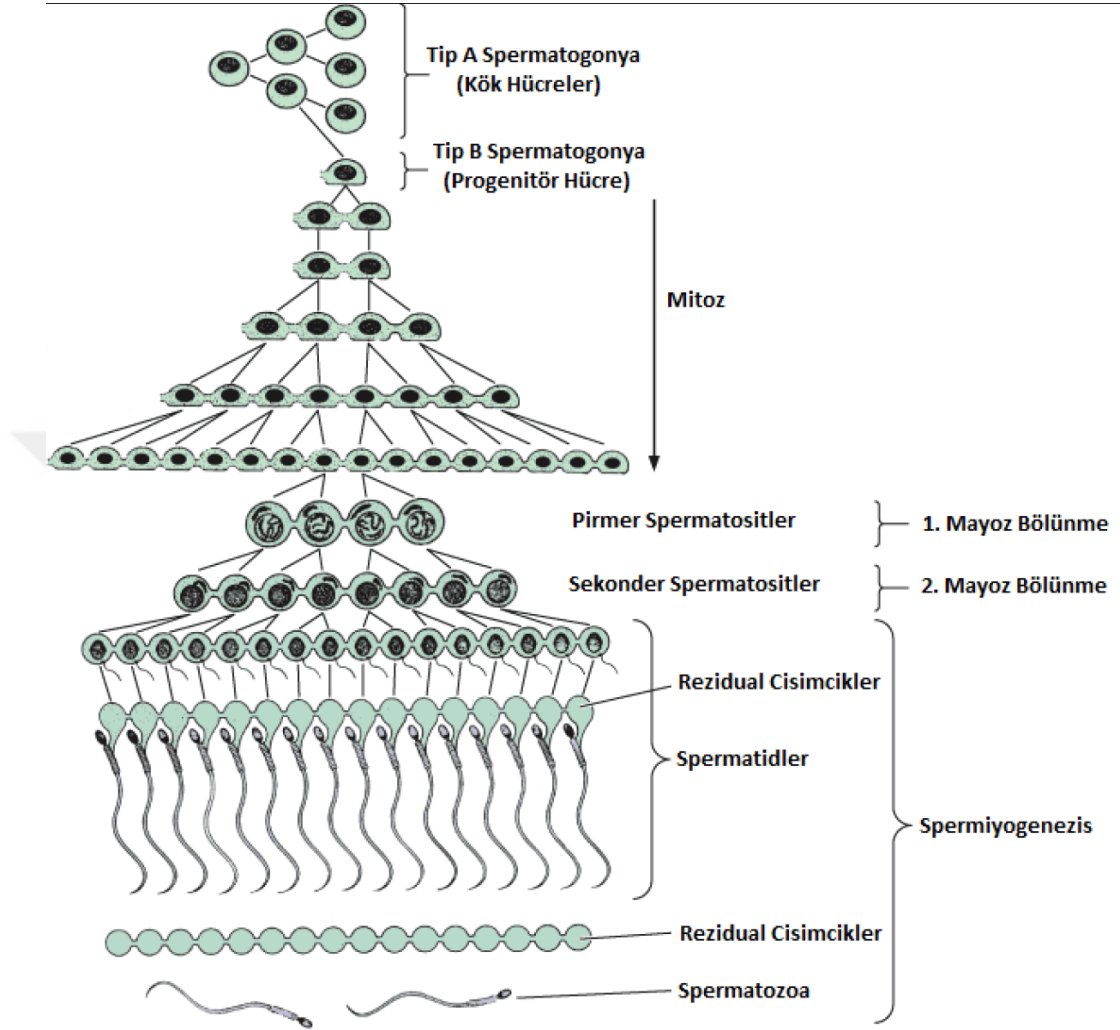
Sperm üretim bozuklukları	Sperm fonksiyon bozuklukları	Duktal sistemde anormallikler
Primer testiküler yetmezlik (Hipergonadotropik hipogonadizm)	Antisperm antikorlar	Obstrüktif
-Genetik	Varikosel	Epididimal-Ejekülatör duktal
Klinefelter Sendromu	İnflamasyon (Prostatit)	Konjenital
Y kromozom delesyonu	Akrozom reaksiyonu olmaması	Enfektif
İmmotil silia sendromu	Biyokimyasal (O ₂ radikalleri)	Vazal (vas deferens)
-Anatomik	Zona pellusidaya yapışma problemi	Konjenital: bilateral yokluğu
Kriptorşidizm (konjenital)	Penetrasyon problemi	Genetik: Kistik fibrozis
Varikosel		Kazanılmış: Vazektomi
Torsiyon		Aksesuar gland enfeksiyonu
Travma		İmmunolojik
-Enfektif		İdiopatik
Kabakulak orşiti		
-Gonadotoksinler: Isı, Kemo- Radyasyon, İlaç, Alkol, Toksinler		Seküel disfonksiyon
-İmmunolojik		
-İdiopatik		
Hipogonadotropik hipogonadizm		
-Hipotalamik		
İsole GnRH yetmezliği		
Kallmann send.		
Tümör		
Eksojen androjen kullanımı		
-Hipofizer		
Konjenital		
Hipogonadotropik send.,		
İzole LH veya FSH eksikliği		
Tümör		
Radyasyon maruziyeti		
Operasyonlar		
Hemokromatozis		

Gelişmiş ülkelerde infertilite problemi %37 oranında kadına, %28 oranında erkeğe ve %35 oranında da her iki bireye aittir. Vakaların %5'inde sebep bulunamadığı için bu olgular açıklanamayan infertilite olarak adlandırılmaktadırlar. Kadın infertilite nedenleri arasında en fazla görülen tubal oklüzyon (%11), pelvik yapışıklıklar (%12), ovulasyon bozuklukları (%25), tubal anomaliler (%11), hiperprolaktinemi (%7), endometriozis (%15) olup %20 vakada ise herhangi bir neden bulunamamıştır.¹²

2.3. Spermatogenez

Spermatogenez; birbirini takip eden spermatositogenez, mayoz bölünme ve spermiyogenez olarak adlandırılan üç evreden meydana gelmektedir. Spermatogoniumların mitoz geçirmesi ile çoğalması ve primer spermatosite dönüşmesi spermatositogenez olarak adlandırılmaktadır.¹³ Seminifer tübül epitelinin büyük bir bölümünü ise spermatogenik hücreler oluşturmaktadır. Spermatogenik hücreler bazaldan lümene doğru farklılaşarak olgunlaştıkları için olgunlaşmanın farklı evrelerinde değişik özellikler gösterirler. Bu özellikler sırası ile spermatogonium, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon şeklindedir.¹⁴⁻¹⁸ Spermatogonium ile spermatozoon oluşumu arasında geçen süre spermatogenez olarak adlandırılır. Primer spermatosit; mayoz bölünme sürecinde birinci mayoz bölünmesi sonra sekonder spermatosit; mayozun ikinci olgunluk bölünmesini göstermesiyle sekonder spermatosit meydana gelir en son ise spermatid oluşumu gerçekleşmektedir. Spermatidlerden spermatozoonların farklanması olayı spermiyogenezdir. Spermatogonium olayından itibaren hücreler birbirleriyle sitoplazma köprüleriyle bağlantılıdır. Sitoplazmanın normal devamlılığı spermatozoonun lümene atılması gerekmektedir. Bu şekilde spermatogenik hücreler birbirleri ile iletişim kurmaktadır (Tablo 2).¹³

Tablo 2. Spermatogenez'in Aşamaları¹⁸



2.4. Normal Semen Parametreleri

Normal ve sağlıklı bir sperm 60 μ boyutlarında olup baş, boyun, orta parça ve kuyruk olmak üzere dört parçadan meydana gelmiştir. Yassı ve oval olan baş 5 μ uzunluk, 3-5 μ enindedir. Başın büyük bölümünü çekirdek oluşturmaktadır. Başın önden 2/3'lük ön bölümünde akrozom adı verilen bir kılıf bulunmaktadır. Akrozomun ise iki tabakası bulunmaktadır. Plazma membranı en dışta bulunurken iç tarafa akrozom kılıfı bulunmaktadır.¹⁴

Semen analizi için bazı parametrelere ihtiyaç bulunmaktadır. Semen analizi parametreleri WHO'ya(Dünya sağlık örgütü) göre yapılmaktadır (Tablo 3).¹⁵

Tablo 3: Semen Analizi Normal Değerleri (WHO'ya göre)¹⁵

Görünüm	Homojen, opak- gri
Hacim (ml)	>% 1,5 (%95 CI: 1,4- 1,7)
pH	7,2- 8,0
Viskozite	< 3
Sperm sayısı (Spermatozoa / ml)	> 15 x 10 ⁶ (%95 CI: 12- 16)
Total sperm sayısı (Spermatozoa / ml)	> 39 x 10 ⁶ (%95 CI: 33- 46)
Total hareketlilik (progresif+ nonprogresif)	> %40 (%95 CI: 38- 42)
Progresif hareketlilik	%32 (%95 CI: 31- 34)
Progresif hareketli sperm sayısı (spermatozoa / ml)	> 3 x 10 ⁶
Morfoloji	>% 4 normal (%95 CI: 3- 4)
Vitalite	> %58 (%95 CI: 55- 63)
Peroksidaz pozitif lökosit sayısı (x 10 ⁶ / ml)	< 1
İmmünobead test	< %50 partikülle kaplı sperm
MAR testi	< %50 partikülle kaplı sperm
Çinko (mmol/ ejakülat)	> 2, 4
Vitalite	> %58 (%95 CI: 55- 63)

2.5. Semen Genel Olarak İncelenmesi

Taze ve sağlıklı semen viskoz, mat, beyazımsı-gri renklerinde bir görünüme sahiptir. Kendine özgü keskin bir kokusu olan semen vücuttan dışarı atıldıktan sonra yaklaşık 15-20 dakika içinde çözünerek bulanıklaşıp akışkan bir görünüm kazanmaktadır.¹⁶

2.5.1. Semende Renk ve Koku

Normal şartlarda semen opak-renksizdir. Ancak cinsel perhiz süresi uzun olan kişilerde sarı, uzun süreli eritrositlerin sayısının artması ile kırmızı-kahverengi renkte antibiyotik kullanımında ise renksiz görülebilir.¹⁷

Semenin kokusu kişinin sağlık durumuna göre kısmen değişiklik gösterse bile kendine has özel bir kokusu bulunmaktadır. At kestanesi çiçeğinin kokusunu andıran semen kokusunun prostat bezinin salgılarından kaynaklandığı düşünülmektedir.¹⁷

2.5.2. Semen Görünüm ve Koagülasyonu

Semenin görünüm ve koagülasyonu; seminal keseden salınan protein kinaz enzimi tarafından düzenlenmektedir.¹⁸

2.5.3. Semen volümü

2-6 ml civarında bir hacme sahip olan semende zengin içeriğin kaybedilmesi sonucu sperm sayısında azlık ve motilitenin farklı çıkması gözlenebilir. Semen miktarındaki azlık ejakülat kanallarında tıkanma veya seminal kesesi agenezisi kaynaklı olabilir. Dolayısı ile tam bir fiziki muayene ile bu özelliklere dikkat edilerek infertilite konusuna çözüm geliştirilmeye çalışılmalıdır. Ejakülat kanallarının değerlendirilmesinde semen früktozu bakılması yol gösterici olabilir.¹⁷

2.5.4. Semende Likefaksiyon (çözülme)

Semen; vesikula seminalislerde prostatik proteolitik enzimler (fibronilizin, fibrinokinaz, aminopeptidaz) aracılığı ile semenogelin proteini ile koagüle olarak sıvılaşmaktadır.

Sağlıklı ve normal bir semen oda ısısında yaklaşık 60 dakika içinde sıvılaşarak bir pipete alındığında küçük damlalar şeklinde akma özelliği göstermektedir. 1 saat içinde sıvılaşmayan semenler patolojik olarak kabul edilmektedir. Sağlıklı olmayan bir semen ise yayılan bir viskozite özelliği göstererek pipetin ucunda 2 cm'e kadar uzayabilmektedir. Semen mukuslu bir yapı olduğu için örnek alınması istendiğinde enzimatik veya mekanik yollar ile sıvılaşması sağlanmaktadır (pipetajla mekanik, 1g/l Bromelain ile enzimatik). Aglütine olmuş semen örnekleri inkubatörde 37 °C de korunmaktadır.¹⁸

2.5.5. Semende pH

Semenin gerçek pH değerinin belirlenebilmesi için son 24 saat içinde laboratuvar şartlarında ölçülmelidir. Önce; bir damla semen pH kâğıdı üzerine yayılır 30 saniye kadar beklenir daha sonra pH kalibrasyon çubuğu ile değerlendirmeye tabi tutulur.¹⁹ Normal semenin pH aralığı 7,2-8 arasında değişirken pH'ın 8'in üzerinde olması akut enfeksiyonu işaret ederken pH'ın 7'nin altında olması ise idrarın semene karıştığı, kronik enfeksiyon (vesikula seminalis'lerde) ve azoospermi ile yardımcı üreme bezleri agenezisi belirteci olabilmektedir (Tablo 4).²⁰

Tablo 4. Semen Sıvısının Kaynakları ve Katkı Miktarları²⁰

Kaynak	Miktar
Uretral ve Bulbouretral bezler	0.1-0.2 cc
Testis, epididimis vas deferens	0.1-0.2 cc
Prostat	0.5-1.0 cc
Seminal vezikül	1.0-3.0 cc
Toplam ejakülat	2.0-5.0 cc

2.5.6. Sperm Hareketliliği (Motilite)

WHO; bütün dünyada kabul edilen semen analizini standardize ettiği çalışmada sperm hareketliliğini 4 kategoriye ayırmıştır.

- i. 3° ve 4° :Hızlı progressif ve hareketli.($>25 \mu\text{m/sn}$ hız)
- ii. 2°: Yavaş ya da duraklayarak hareket eden spermeler
- iii. 1°: Yerinde hareketlilik ($5 \mu\text{m/sn}$ hız)
- iv. 0°: Hareketsiz spermeler

Sonuçların doğru olup olmadığını değerlendirmek için en az 2 farklı inceleme yapılarak 200 sperm hücrelerinin hareketleri değerlendirilmeli ve aradaki fark %5'ten küçük olmalıdır.²¹

Morfolojik Değerlendirme: Semen analizinin en önemli aşamasını meydana getirmektedir. WHO; spermin morfolojik değerlendirilmesinde baş, boyun ve kuyruğun detaylı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Morfolojik değerlendirme için 100-200 arasında spermin değerlendirmeye alınması gerekmektedir.²²

Baş; Düzgün kenarlı ve oval şekilli olmalı akrozomal yüzey ise baş kısmının yüzeyinin 1/3'den fazla alanı sarmalıdır.

Orta kısım; Eni boyunun 2/3'den fazla olmalı, silindir şekilli ve dış kısmı pürüzsüz olmalıdır.

Kuyruk; Silindir şekilli, kıvrımlı ve bükümlü olmalıdır.

2.6. Semen Analizi ve Sperm Hazırlama Yöntemleri

Spermiyogram analizi için öncelikle 3-5 gün önce cinsel perhize girilmelidir. Ancak perhizin 10 günü aşmamasına özen gösterilmelidir. Aksi takdirde hareketliliğin azalmasına neden olabilmektedir. Ayrıca spermiyogram analizi 1-2 ay aralıklar ile 3 defa tekrarlanmalıdır. Analiz sonuçlarının birbirine çok yakın olmamasına özen gösterilmelidir.

Sonuçların yakınlık oranları %20'ye yakın olursa tekrar örnek alınmaz fakat %20'den fazla olması durumunda spermiyogram testi tekrarlanmalıdır.¹⁶

2.6.1. Yıkama ve Doğrudan Yüzdürme Metodu

14 ml'lik konik steril hacimli tüplere konan ejakülat ½ oranında sulandırılarak 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir ve üstteki sıvı kısım pipetle yavaş bir şekilde alınıp atılır. Üzerine kültür vasatı eklendikten sonra santrifüj edilir ve dipte kalan pelet tekrar santrifüj edilir.²³

Doğrudan yüzdürme metodu olarak Swim-up yöntemi kullanılmaktadır. Swim-up yöntemi; hem total hareketli sperm sayısının belirlenmesi amacı ile hem de inseminasyon için gerekli olan bütün hücrelerin hareketliliği ile morfolojik yapılarını tespit etmek amacı ile kullanılan bir yöntemdir. Yıkamadan sonra elde edilen örneklere kültür vasatı verilerek alt ve üst katman oluşturulur ve hiçbir şekilde katmanların birbirine temas etmemesi sağlanmış olur. Kaliteli spermlerin üst tarafa çıkabilmeleri için 45° eğim sağlanarak 37 °C'de 1 saat inkübe edilir. 1 saat sonra üstten alınan örnek maklerde sayılarak swim-up sonucu total kaliteli sperm sayısı x volüm olarak kaydedilir.²²

Bir diğer yüzdürme protokolü olan swim-down metodunda ise semen örneği 1 ml'lik kültür vasatı ile beraber steril konik tüpler içerisine konulur. Semen örneği katmanlandırılıp inkübe edilir ve dipteki sıvının 3/4'ü sayıma alınır ve inseminasyon işlemi için kullanılır. Toplam hareketli sperm morfolojinin %5'in altında ya da sperm sayısının çok düşük olduğu olgularda yüzdürme yöntemlerinin başarı oranı oldukça düşüktür.²³

2.6.2. Yoğunluk sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi

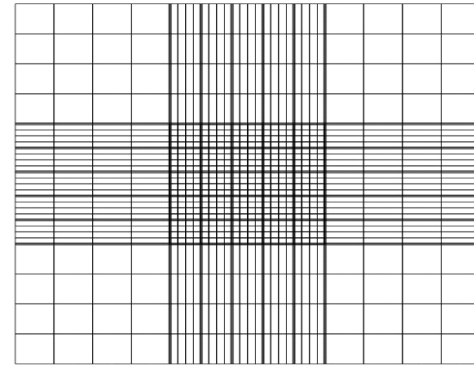
Gradient yöntemi; normal hareketli spermlerin dipte kalarak anormal spermler ile ölü hücrelerin ara katlarda kalmaları esasına dayanmaktadır.

Bu yöntem kısaca; Ficoll, Percoll, Nycodenz, albumin ve sükröz polimerleri gibi malzemelerle gradientler meydana getirip santrifüj etmek sureti ile sperm hücrelerinin sıvı kolonlardan süzdürülmesi esasına dayanmaktadır. En yoğun tabaka her zaman en altta olduğu için spermelerde bu yoğun tabakaya doğru nüfuz ederler. Anormal spermiler ile diğer maddeler daha az yoğun olan en üst tabakada bulunurlar. Böylece sağlıklı spermiler ile anormal spermiler birbirinden ayrılmış olur. Bu yöntem özellikle; sperm dışı hücre sayısının yüksek olduğu ve hareketli sperm sayısının total sperm sayısından düşük olduğu durumlarda kullanılmaktadır.²⁴

Oda ısısında 60 dakika içinde sıvılaşmaya bırakılan semen örnekleri tam sıvılaşmaları sağlandıktan sonra (çalkalama inkübatörde bekletme ya da pipetle çekme sureti ile) 2-3 ml ejakülat alınarak gradyen katların üzerine konur ve 1500 rpm'de 10-15 dakika santrifüjlenir. Kullanılmayacak olan üst faz ile ara faz atılır ve dipte kalan çökelti bırakılır. 2 ml HTF solüsyonu çökelti üzerine eklenerek santrifüj edilir yıkanır ve tekrar 0.5 ml HTF solüsyonu konarak sperm süspansiyonu elde edilir.²²

2.6.3. Sperm Dansitesi/Konsantrasyonu Ölçümü; Hemositometrik Yöntem

%1'lik formalin tampon solüsyonu ile (metilen mavisi ilaveli) X20 dilüsyon elde edebilmek için 10 µl semenin içine 190 µl tampon solüsyonu ilave edilir. Neubauer sayma kamarasına 10 µl kadar karışımdan konur ve lamelle kapatılır. 2-3 dakika sonra merkezdeki kareler sayılır (4 köşe 1 merkez) sperm konsantrasyonu/ml cinsinden =Sayılan hücre x 10⁶ olarak hesaplanır (Şekil 1). WHO'ya göre sperm konsantrasyonu için Hemositometrik yönteminin kullanılması önerilmektedir.



Şekil 1. Neubauer Kamarasında Sayma Alanları²⁵

2.6.4. Sperm Konsantrasyonunun Makler Sayma Kamarası İle Ölçümü

Makler kamarasına alınan 4 mikrolitrelik semen örneğinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri kapatılır. Işık mikroskopunda 20x'lik büyümede en az 10 alan sayılır. Ancak sperm sayısı düşük ise bütün alanının sayılması daha doğru sonuç verecektir. Bütün alan tarandıktan sonra hareketli ve hareketsiz spermler sayılarak kayıt edilir.²⁵

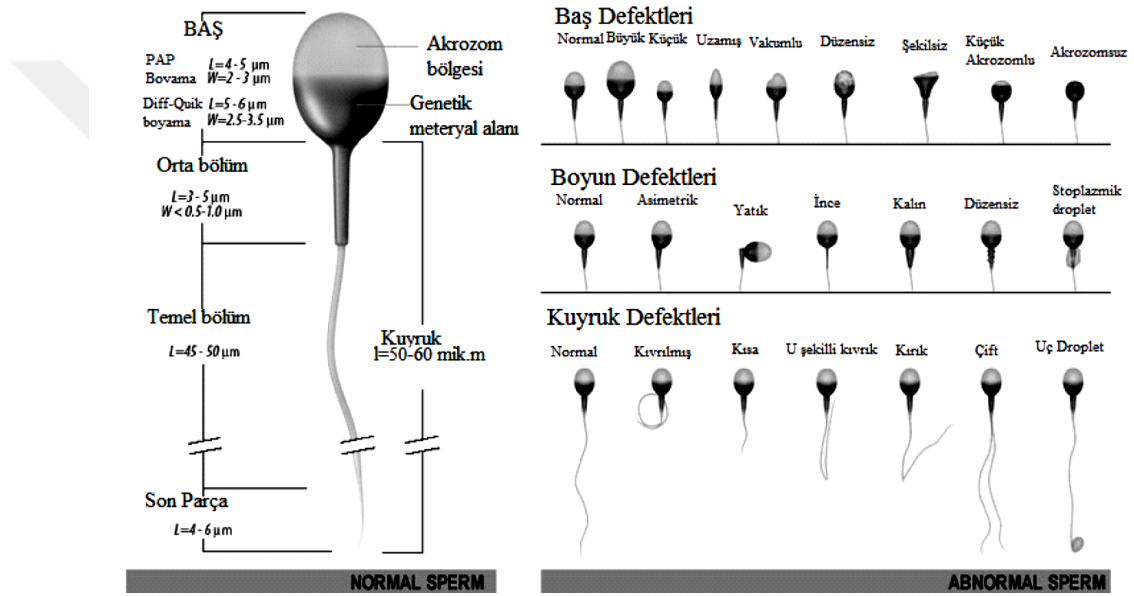


Şekil 2. Makler Sayma Kamarası

2.6.5. Kruger Kriterlerine Dayalı Morfolojik (şekilsel) Değerlendirme

İnfertilite tedavisi için total semen örneğinde ne kadar hareketli spermin olduğu veya hareketsiz spermlerin sayısı oldukça önemlidir. Semen morfolojik yapısı tayin edilirken Kruger standartlarının kullanılması oldukça önemlidir. Bu kriterler spermin baş, boyun kuyruk yapısı hakkında bilgi vererek anomali olup olmadığını ortaya çıkarmaktadır.

Bu değerlendirmeler kısaca şu şekilde yapılmaktadır; hematoxylin, giemsa ya da Diff quick ile boyanan spermier immersiyon objektifinde incelenerek akrozomu yapısı, nukleusda anomali olup olmadığı varsa anomali sayısı ve kuyruk yapısı değerlendirilir. Değerlendirmenin doğru sonuç vermesi için en az 200 sperm sayılması gerekmektedir. WHO'nun 2010 raporuna göre %4 ve üzeri normal sperm taşıyan semen örnekleri morfolojik olarak normal kabul edilir.²⁵



Şekil 3. Kruger Morfolojik Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi Değerlendirilmesi²⁵

2.7. İn Vitro Embriyo Gelişimi

Döllenmeden hemen sonra bir ya da iki fazlı kültür ortamında embriyo gelişimi takip edilerek kontrollü bir şekilde transfer işlemi gerçekleştirilmektedir. Transfer günü ise rastgele değil yumurta sayısı ile gelişen embriyonun kalitesine göre belirlenmektedir.

Normal kabul edilen embriyo 25-30. saatte iki hücre, 38-40. saatte, üç-dört hücre, 54-60. saatte, altı-sekiz hücre ve 4. günde birleşme işaretlerine bağlı olarak on ve üzerinde hücreye sahip olan, kompakt embriyodur.

Fertilizasyonun sağlıklı kabul edilebilmesi için iki pronükleus ile birinci ve ikinci kutup cisimciklerinin gözlenmesi gerekmektedir. İlk mitotik bölünme 25-30 dakika sonra başlar ve iki hücreli embriyo hâlini alır. Meydana gelen embriyolar; blastomer simetrisi ve büyüklüğü, her bir blastomerdeki fazla nükleus varlığı (multinukleasyon) ve fragmentasyon yüzdesi gibi parametreler açısından değerlendirmeye tabi tutulur.²⁵

Kalite değerlendirmesine göre ise 1. Kalite embriyolar; belirgin granül yapı göstermeyen, %0-5 arasında fragmentasyon içeren ve eşit büyüklükte blastomere sahip olan embriyolardır (Tablo 5).²⁶

Tablo 5. Bölünme Evresinde Embriyo Sınıflaması¹⁴

1. Kalite	Eşit blastomer büyüklüğüne sahip granülasyon göstermeyen %0-5 oranında fragmentasyon içeren embriyo
2. Kalite	Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, %10-15 oranında fragmentasyon içeren veya granülasyona sahip embriyo
3. Kalite	Çok az blastomer farklılığı var, fragmentasyon %10 oranında ve granülasyon var
4. Kalite	Blastomer sayısı net değil fragmentasyon %30 dan fazla, ileri granülasyon

Erken Embriyogenezde İleri Dönem (4-6. günler): Fertilizasyonun 5. günündeki hücre sayısı 16-20 arasındadır. Bu günlerde hücrelerarası bağlantı aratarak kompakt yapının oluşması gözlenir. Morula olarak adlandırılan bu aşamadan sonra kavitasyon ile blastokist dönemi başlar (Tablo 6).²⁷

Tablo 6. 5. Günde Embriyo Gelişimin Sınıflandırılması ¹⁸

1. Kalite	Erken blastosist, kavitasyon gözlenen ve vokualizasyon gibi anomali içermeyen embriyo
2. Kalite	Morula veya birleşmiş embriyo morfolojisine sahip anomalinin bulunduğu embriyo
3. Kalite	Morula ya da birleşmiş embriyo morfolojisine sahip iki üç anomalinin bulunduğu embriyo
4. Kalite	On ya da daha fazla blastomer bulunan herhangi bir birleşme göstermeyen embriyo

2.8. Azoospermi

Mikroskopik incelemelerde ejakülat içeriğinde hiçbir şekilde sperm tespit edilememesine yani sperm bulunmaması *azoospermi* olarak tanımlanmaktadır.²⁸ *Azoospermi* tanısı koyabilmek için en az iki semen örneğinin incelenmesi gerektiği bildirilmektedir. *Azoospermi* bütün toplumun %1'inde görünürken infertil erkeklerin ortalama %10-15'inde görülmektedir.²⁵ *Azoospermi* nedeninin obstrüktif mi non obstrüktif mi olup olmadığı belirlenebilir. Bu şekilde uygun tedavi seçenekleri geliştirilebilir.²⁹

Obstrüktif Azoospermi (OA, Tıkanıklığa Bağlı Olan Azoospermi): Doğuştan sperm kanallarının bir bölümü ya da tamamının olmaması, genital enfeksiyonlar veya cerrahi operasyonlar sonucu meydana gelebilir. OA'da spermatogenez normaldir ancak seminal kanallar tıkalı olduğu için semende sperm eksikliği meydana gelmektedir. Bu tıkanıklık; vas deferens eksikliği, vasktomisi yada enfeksiyonlar sonucu meydana gelmiş olabilir.³⁰

Non Obstrüktif Azoospermi (NOA, Tıkanıklığa Bağlı Olmayan Azoospermi): Testislerin doğuştan yukarıda olması, genetik defektler, testis torsiyonu, radyasyon yada geçirilen enfeksiyonlar sonucu meydana gelen duruma ise Non obstrüktif Azoospermi adı verilir. NOA, OA'ya göre daha ağır bir durumdur.

Çünkü; sperm üretimi ya hiç yoktur yada büyük hasar görmüştür. Azoospermihastalarının yaklaşık %60'ında NOA bulunmaktadır ve erkek infertilitesinin en ağır formunu meydana getirmektedir. Bu durum; sıcaklık, radyasyon, ilaç kullanımı, varikosel, enfeksiyon, kanser ve genetik sebeplerin bir veya birkaçının birleşmesi ile meydana gelebilir.³¹

2.9. MESA Yöntemi:

Epididimise cerrahi olarak girilerek doku parçacıkları alınması ve sperm elde edilmesi yöntemine MESA yöntemi adı verilmektedir. Tıkanıklığa bağlı olan *azoospermi* olgularında kullanılan bir yöntemdir. Alınan doku örneği androloji laboratuvarında makler kamarası altında incelenmektedir.³²

Eğer sperm hareketlilik ve sayısı yeterli ise sonraki işlem ICSI yöntemi ile devam eder.²⁵

2.10. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI); özel ısıtıcı donanımına sahip m-manipülatör yardımı ile invert mikroskop tablası üzerinde cam mikropipet kullanarak sperm oositin sitoplazmasına enjekte edilmesi işlemine ICSI adı verilmektedir.³³

Mikroenjeksiyon işleminde öncelikle bütün malzemelerin tek kullanımlı steril olması gerekmektedir. Sperm ve oositler için 25-30 µm lik damlacıklar oluşturularak üzeri yağ ile kaplanmaktadır. Kabin içine sperm ve oositler kendilerine ait olan yerlere yerleştirilmektedir. Mikroskop altında sperm hareketliliği ve morfolojisi kontrol edilmektedir. Enjeksiyon yapılacak sperm kuyruklarına bastırılarak sabitleştirilmektedir. Sperm baş kısmına zarar verilmeden kuyruk kısmından tutulup enjeksiyon pipetine alınır ve yumurtanın içine enjekte edilmektedir. Bütün yumurtalara aynı işlem uygulandıktan sonra bütün yumurtalar özel besi ortamlarına alınarak yaklaşık 16-18 saat beklenir ve daha sonra döllenme kontrolü yapılmaktadır.³

3. GEREÇ YÖNTEM

Bu çalışma da; OTA & Jinemed Hastanesi'nde 2012-2015 yılları arasında yapılan ICSI uygulamalarından elde edilen verilerin 349'un analizi yapılmıştır. Kadın yaşı 38 ve altında bulunan, PCO, endometriosis ve zayıf yanıt veren olgular dışındaki hastalar seçilmiştir. Sperm analizi WHO standartlarına göre yapılmıştır. Ejakülatta canlı sperm belirlendiği zaman silika gradyanı (iki katmanlı,%90 ve %50, Supra Sperm®, Origio®) üzerinde sperm hazırlığı yapılmıştır.

Hastalara iki ardışık semen analizi yapıldıktan sonra azoospermi tanısı konulmuştur. NOA veya OA tanısı, tıbbi öykü, fiziki muayene, hormonal durum, genetik çalışma ve testis hacimleri baz alınarak tespit edilmiştir. NOA olgularında TESE açık biyopsi prosedürüyle yapılmıştır. Testis canlı sperm elde etmek için doku hafifçe ezilmiştir. Hücresel süspansiyon,%40 silika gradyan süspansiyonu üzerine yüklenmiştir ve 15 dakika boyunca 2000 devir / dk.da santrifüje tabi tutulmuştur. Silika tabakası içinde ve / veya süpernatant içindeki pellette (testiküler sperm (TS) ait canlı spermler, IVF mediumunda yeniden süspansiyon hâline getirilmiştir ve IVF-ICSI uygulamasına kadar standart hızlı dondurma yöntemine göre sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. OA vakalarında ise MESA yöntemi kullanılarak genel anestezi altında epididimal sıvı alınmıştır. Daha sonra epididimden (epididimal sperm (ES)) ekstrakte edilen spermler, TESE'de olduğu gibi dondurulmuştur. Çözülme, ICSI'nin hemen öncesinde gerçekleştirilmiştir; spermler 37 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir ve sperm süspansiyonu, önceden ayarlanmış 2 ml sperm yıkama ortamına yavaşça karıştırılmıştır. Tek bir yıkama adımından (yıkama ortamında 5 dk. santrifüj) sonra, toprak birkaç damla yıkama ortamı içinde yeniden süspansiyon edildi ve ICSI hazırlanması için ters mikroskop altında değerlendirilmiştir.

Tüm hastalara standart protokollere göre ICSI ve embriyo transferi (ET) uygulanmıştır. Kadınlara estrojen ön tedavisi ile antagonist protokolle kontrollü yumurtalık uyarımı yapılmıştır.

Rekombinant insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu, çapı ≥ 17 mm olan üç veya daha fazla foliküle uygulanmıştır. 34 ila 36 saat sonra oositler toplanmıştır. Daha sonra ICSI uygulaması matür M2 oositlerine uygulanmıştır.

Enjekte edilen oositler daha sonra steril kültür ortamında teker teker mikrodroplara yerleştirilmiş bir üç gazlı inkübatöre yüklenmiştir. Embriyo kültürü 37 °C'de düşük oksijen basıncı (%5O₂, %6CO₂) ile kontrollü bir atmosfer ortamında yapılmıştır, embriyolar transfere kadar beş gün kültürde bırakılmıştır. Fertilizasyon, erken klivaj, 2, 3 ve 5. gün embriyo morfolojileri her gün embriyolar takip edilerek not edilmiştir.

Klivaj aşamasındaki embriyo(lar) veya tek blastosist transferi, geçmişine, önceki IVF girişimleri ve erken embriyo gelişimine bağlı olarak seçilmiştir. Birinci veya ikinci IVF sikluslarından geçen genç kadınlar (35 yaşın altında) genellikle tek blastosist transferi için danışmanlık hizmeti almışlardır. Bölünme evresi embriyo transferi (3. gün) durumunda, tekli veya çiftli embriyo transferi tıbbi personel ve çift tarafından birlikte kararlaştırılmıştır. Embriyo transferi yapıldıktan 12 gün sonra bir gebelik testi yapılmış ve eğer pozitifse, klinik gebelik ultrasonografiyle Amniyon kesesi ve fetal kalp aktivitesi 5 hafta sonra doğrulanmıştır.

ICSI işleminden sonraki bütün adımlar detaylı bir şekilde süreleri ile not edilmiştir. Sperm orijinine göre gruplar arasında farklılıklar karşılaştırılmıştır. Temel karşılaştırmalar için, Student veya Wilcoxon'un testleri; sürekli değişkenler için, X² veya Fischer'in nitel değişkenler testi uygulanmıştır.

İstatistiksel analiz SPSS (sürüm 20) ile yapılmıştır. P değerleri <0.05 anlamlı bir olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Ejakülat spermi, Tese ve Mikro TESE uygulaması sonrası elde edilen spermiler ile yapılan ICSI uygulamaları sonucu embriyo gelişimi, gebelik ve canlı doğum oranları retrospektif olarak incelenmiştir.

Tablo 7. Canlı Doğum ve Negatif Gebelik Karşılaştırması

Hasta Sayısı (n=)	Canlı Doğumla Sonuçlanan Gebelik n (%)	Gebelik Negatif n (%)
TESE (79)	21 (26,5)	58 (73,4)
Mikro TESE (57)	15 (26,3)	42 (73,6)
Ejakülat (213)	53 (24,8)	160 (75,1)
Toplam (349)	89 (25,5)	260 (74,4)

Tablo 7’de olgular arasında canlı doğum oranlarının ve negatif gebelik oranlarının arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

Tablo 8. TESE Olgularında Canlı Doğum ile Sonuçlanan Gebelik ve Gebe Olmayan Grup Karşılaştırması

TESE Olgularında N=79	Canlı Doğumla Sonuçlanan Gebelik	Gebe Değil	p
Kadın yaşı	29,2±5,2	32,6±5,6	0,087
Erkek yaşı	34,2±6,1	38,4±8,2	0,134
Bazal FSH (IU/ml)	7,1±1,6	7,8±3,2	0,506
LH (IU/ml)	4,7±2,3	4,6±3,2	0,936

Tablo 8’de TESE olgularında gebe olan ve olmayan olguların bazal hormon değerlerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Tablo 9. Mikro TESE Olgularında Canlı Doğum ile Sonuçlanan Gebelik ve Gebe Olmayan Grup Karşılaştırması

Mikro TESE Olguları N=57	Canlı Doğumla Sonuçlanan Gebelik	Gebe Değil	P
Kadın yaşı	32,7±2,4	31,4±4,7	0,433
Erkek yaşı	33,6±3,6	36,2±5,5	0,195
FSH	7,3±2,7	6,4±2,1	0,315
LH	6,2±2,7	5,1±2,7	0,255

Tablo 9’da Mikro TESE olgularında gebe olan ve olmayan olguların bazal hormon değerlerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Tablo 10. Ejakülat Spermli Olgularında Canlı Doğum ile Sonuçlanan Gebelik ve Gebe Olmayan Grup Karşılaştırması

Ejakülat Spermli N=213	Canlı Doğumla Sonuçlanan gebelik	Gebe Değil	P
Kadın yaşı	32,6±3,4	32,4±3,5	0,456
Erkek yaşı	34,2±2,9	32,2±2,6	0,198
FSH	7,6±3,2	6,9±4,2	0,325
LH	6,3±2,8	5,7±3,2	0,415

Tablo 10’da Ejakülat spermli olgularında gebe olan ve olmayan gruplarda bazal hormon değerleri anlamlı farklılık göstermemiştir.

Tablo 11. Gruplar arasında gebelik ve embriyo erken klivajı açısından değerlendirmesi

		Gruplar			p*
		Ejakülat Spermisi	Mikro TESE	TESE	
Gebelik durumu	Pozitif	%25	%26,3	%26,5	0,513
	Negatif	%75	%73,7	%73,5	
Erken bölünme	Var	%27,1	%14,3	%19,4	0,116
	Yok	%72,9	%85,7	%80,6	

*: Ki-Kare Analizi

Tablo 11’de Gruplar gebelik durumu ve erken bölünme oranları bakımından Ki-Kare analizi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Tablo 12. Grupların embriyo parametreleri açısından değerlendirilmesi

	Gruplar			P
	Ejakülat Spermisi	Mikro TESE	TESE	
Blastomer 2. gün 4 hücre	3,1±2,2	2,2±1,4***	3,1±2,1	0,046
Blastomer 3. gün 8 hücre	2,7±1,6	1,8±1,5***	2,5±1,6	0,008
Toplam fertilize oosit	4,3±2,9***	2,4±2,1***	3,9±3,1***	0,000
Toplam embriyo sayısı	4,4±2,8***	2,6±2,3***	3,9±3,1***	0,000
Toplam grade 1	2,7±1,7	2,2±1,6	2,1±1,6***	0,038
Toplam grade 2	2,0±1,3	1,9±0,8	2,2±1,4	0,639
Trans grade 1	1,9±0,8	1,6±0,8	1,7±0,8	0,299
Trans grade 2	1,4±0,7	1,5±0,6	1,5±0,7	0,527

***: p <0.05

Tablo 12’de Üç grup ortalamaları Kruskal-Wallis Test ile karşılaştırılmış, anlamlı fark bulunan değişkenlerde ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır. Blastomer 2. gün 4 hücre ve Blastomer 3. gün 8 hücrede farklı grup Mikro TESE olduğu gözlemlenmiştir ve diğer iki gruba göre ortalama düşük bulunmuştur. Toplam fertilize oosit, toplam embriyo sayısı üç grupta da farklılık gözlemlenmiştir. Toplam grade 1 de TESE grubu ejakülat grubundan farklıdır. TESE ile Mikro TESE arasında fark saptanamamıştır.

5. TARTIŞMA

Ejakülat'ta hiç sperm bulunmaması şeklinde tanımlanan azospermi erkek infertil bireylerin yaklaşık %1'inde bütün erkek kaynaklı infertil olguların ise ortalama %15'inde görülmektedir. Azosperminin en fazla görülmesinin nedeni sperm taşıyıcı kanallar açık olduğu hâlde olgun olarak yeteri derecede sperm üretilmemesinden kaynaklanmaktadır.³⁵ Tıkanıklığa bağlı olmayan azospermi olarak tanımlanan bu durum testisin kendi morfolojik yapısındaki defektlere yada testisleri sperm üretimi için tetikleyen hipofizden salgılanan hormonlara ait hastalıklara bağlı olabilmektedir. Azospermi vakalarının tedavisinde en önemli basamak, spermatogenezin sürdüğü küçük odakların gösterilerek, bu odaklardaki olgun (matür) sperm hücrelerinin elde edilmesidir.³⁶ Bu çalışmada sperm kaynağı farklı olan, ejakülat spermi, TESE ve Mikro TESE olgularında intrastoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemi kullanarak embriyo gelişimi, gebelik ve canlı doğum oranları retrospektif olarak araştırılmıştır.

Olgular arasında canlı doğum oranlarının ejakülat sperminde yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmamızda canlı doğum oranı TESE olgularında %26,5 Mikro TESE'de %26.3 iken ejakülat sperminde bu oranın %25 olduğu sonucu elde edilmiştir. Buran (2015); Erkek infertilitesinde sperm kaynağına göre ICSI işlemi ile elde edilen embriyoların embriyo izleme yöntemi ile retrospektif olarak değerlendirdiği çalışmasını 20 normal spermlili, 20 TESE ve 18 MESA uygulaması ile gerçekleştirmiş ve sonuç olarak ejakülat spermlerinde blastokiste gidiş %70, MESA'da %27.8, TESE'de ise %35 bulmuştur. Yani ejakülat sperminde canlı doğumun daha fazla olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Weng ve ark. (2014)'nın mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu ve testiküler sperm ekstraksiyonundan türetilen embriyoların kromozom anomalilerini araştırdıkları çalışmalarında ejakülat spermi, TESE ve Mikro TESE olgularında dölleme ve gebelik oranları arasında fark bulunmadığını ifade etmişlerdir. Ancak MESA grubunda yüksek oranda kromozomal anomali olduğunu tespit etmişlerdir.³⁷

Ejakülat spermi, TESE veya Mikro TESE yöntemlerinde fertilizasyon tamamen hasta grubuna göre değişiklik gösterebilmektedir. Kimi grupta TESE’de çok düşük başarı gözlenirken bir başka grupta yüksek fertilizasyon gözlenebilmektedir. Örneğin; non-mozaik Klinefelter sendromlu hastalarda mikro TESE’nin başarı oranı %69 iken³⁸ bir başka çalışmada TESE’nin başarısının %22 olduğu belirtilmiştir.³⁹ Ancak genel hatları ile literatürde belirtildiği gibi bizim çalışmamızda ejakülat sperminin testis spermine göre daha yüksek fertilizasyon oranı ve daha yüksek kalitede embriyo geliştirdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmamızda Mikro TESE olgularında gebe olan ve olmayan olguların bazal hormon değerlerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Çetinkaya ve ark. (2016)’nın ICSI uygulaması ile kadın yaşı ve overyen rezervinin değerlendirilmesi konusunda dondurulmuş testis spermatozodu ile obstrüktif olmayan azospermik hastalar üzerinde yaptıkları çalışmaya göre de ejakülat spermi grubu ile Mikro TESE grubu karşılaştırılmış ve gruplar arasında bir farkın olmadığı ifade edilmiştir.⁴¹ Yapılan benzer bir çalışmada ise taze spermler ile dondurulmuş spermler mikro TESE yöntemi ile fertilizasyon işlemine alınmış sonuç olarak her iki grupta da aynı kalitede embriyo elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır. Dolayısı ile mikro TESE yöntemi tek başına ICSI için daha başarılıdır şeklinde bir sonuca ulaşmak doğru değildir.

Sperm sentrozomu erken embriyo gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle embriyonik bölünme, genomik aktivasyon ve blastosist oluşumu üzerine babanın önemli etkisi bulunmaktadır.⁴² Ayrıca embriyo kalitesi; spermatogenezin bozulduğu ciddi erkek infertilitesinde özel bir endişe kaynağıdır. Zaman atlamalı görüntüleme ve morfokinetik testler, testis ve epididimiden ekstre edilmiş spermden elde edilen hasta embriyolarındaki embriyonik gelişim modelini incelemek için eşsiz bir fırsat sunmaktadır.⁴³ Kullanılan yöntemlerden biri de TESE yöntemidir. Çalışmamızda embriyo kalitesi değerlendirilmesinde TESE olgularında canlı

doğum ve gebelik olmayan grup karşılaştırılmasında gebelik olan grupta daha kaliteli embriyo elde edildiği gözlenmiştir. TESE yöntemini kullanarak erken embriyo morfokinetiğini araştıran Gill ve Desai. (2016); Testis sperminden türetilmiş embriyolar, embriyonik genom aktivasyonunun en erken morfolojik göstergelerinden biri olan kompaksiyona kadar gelişimin erken evrelerinde önemli gecikmeler gösterdiğini fakat blastokist aşamasında benzer ilerlemeler kaydettiklerini belirlemişlerdir.⁴⁴

Mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonu (Mikro TESE), sperm eldesi için tercih edilen yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır.⁴⁵ Çalışmamızda Mikro TESE olgularında doğumla sonuçlanan gebeliklerde embriyo klivajı ve G1 embriyo sayısının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgumuzun aksine Tüfekçi ve ark. (2015)'i cerrahi olarak alınmış sperm ile spermatozoanın kullanılarak intrasitoplazmik sperm enjeksiyonun IVF sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmada Mikro TESE'nin gebe olan ve olmayan gruplar arasında embriyo kalitesi yönü ile farklılık göstermediğini belirtmişlerdir.⁴⁶ Bizim bulgumuza paralel olarak yapılan farklı çalışmalarda da Mikro TESE'de canlı doğum ile sonuçlanan gebeliklerin embriyo klivajı ve G1 embriyo sayısının daha yüksek olduğu ifade edilmektedir.

Bu farklılık semen kalitesindeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.^{39,41}

Çalışmamızda ejakülat spermi kullanılan olgularda gebe olan grupta daha yüksek klivaj, iyi embriyo sayısı yüksek ve transfer edilen iyi embriyo sayısı yüksek bulundu. Lammers ve ark. (2015)'nin taze elde edilmiş sperm ile ejakülat sperminin embriyo kalitesi üzerinde etkilerinin olup olmayacağını araştırdıkları çalışmalarında morfokinetik analizler sonucunda taze boşalmış sperm ile cerrahi olarak elde edilmiş sperm arasında bir fark olmadığını ifade etmişlerdir.⁴⁷

Çalışmada her ne kadar t3, t8 ve S2'de morfokinetik farklılıklar gözlenmiş olsa da genel değerlendirmede her iki şekilde elde edilmiş embriyolarda kalite ve morfokinetik farklılığın olmadığı belirtilmiştir. Daha ileriki çalışmalar, blastosist evresine kadar çok yönlü olarak farklı sperm kaynakları (taze sperm, TESE, Mikro TESE) kadar embriyo izleme yapılarak sonuçlar karşılaştırılabilir.

Oehninger ve ark. (1998)'nın Semen kalitesi: In vitro fertilizasyon / intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda gebelik sonucu üzerinde etkisinin olup olmadığını araştırdıkları çalışmada ICSI uygulamalarının yüksek fertilizasyon başarısı gösterdiği ve ağır infertilite olgularında dâhi olumlu sonuçlar alındığı belirtilmiştir.⁴⁸

6. SONUÇ

Retrospektif çalışmamızda erkek infertilitesinin söz konusu olduğu durumlarda yardımcı üreme tekniği olarak ICSI uygulamasının yapılmasının fertilizasyon başarısını artırarak canlı doğum oranını arttırdığı gözlenmiştir.

Ejakülat spermi, Mikro TESE ve konvansiyonel TESE ile ICSI denemeleriyle olgular arasında canlı doğum oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Ejakülat spermi ve standart TESE kullanılan olgularda, Mikro Testiküler Sperm kullanılanlara göre klivaj oranı, iyi embriyo sayısı ve transfer edilen iyi embriyo sayısı anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

7. ÖZET

FARKLI SPERM KAYNAĞINA BAĞLI OLARAK ICSI UYGULAMASI SONUÇLARININ İNCELENMESİ

Erkek kaynaklı infertilitede farklı sperm kaynakları kullanılarak embriyo oluşması sağlanabilmektedir. Bu çalışmada azospermik olgularda embriyo gelişiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Azospermik olguların embriyo gelişimi normal olgular ile karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada OTA & Jinemed Hastanesi'nde 2012-2015 yılları arasında yapılan normospermik, Mikro TESE ve TESE uygulanmış ICSI olgularından elde edilen verilerin 349'unun analizi yapılmıştır.

Sonuç olarak; canlı doğum oranlarının gruplarda farklılık göstermediği, Mikro TESE olgularında embriyo klivajı ve G1 embriyo sayısında diğerlerine göre anlamlı azalma gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Normospermi, TESE, mikro Tese, embriyo gelişimi

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF ICSI APPLICATION RESULTS BASED ON DIFFERENT SPERM SOURCES

Male-derived infertility can be achieved by embryo formation using different sperm sources. In this study, it was aimed to examine embryo development during azoospermic events. Embryo development of azoospermic cases was compared with normal cases.

In this study, 349 of the ICSI applied cases data obtained from the cases of normospermic, microtese and tese in OTA & Jinemed Hospital between the years of 2012-2015 were analyzed.

As a result; live birth rates did not differ between groups, embryo cleavage in micro TESE cases and G1 embryo counts were significantly lower than the others.

Key words: Normospermia, TESE, microtese, embryo development

9. KAYNAKLAR

1. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Tournaye H & Krausz C. Guidelines in male infertility. European Association of Urology 2012;62 (2): 324-32.
2. Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL & Aitken RJ. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. Fertility and Sterility 1994; 62(3): 599-605.
3. Candan Ö. Obstrüktif Ve Non Obstrüktif Azoospermi Hastalarından Elde Edilen Sperm Örnekleri İle Embriyo Gelişimi Ve Gebelik Oranları.Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2017.
4. Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM, Repetto HEH & Blanco AM. Asthenozoospermia: analysis of a large population. Archives of Andrology 2003;49(5): 343-349.
5. Schwarzer JU, Fiedler K, v Hertwig I, Krüsmann G, Würfel W, Schleyer M, Mühlen B, Pickl U, Löchner-Ernst D. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmatic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. Urol Int. 2003; 70(2):119-23.
6. Antczak, M. and Van Blerkom, J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differentialelimination of regulatory proteins from polarized domains. Hum. Reprod 1999; 14: 429-447
7. Definition of 'Infertility'. The Practice Committee of the American Society for Reproductive medicine. The American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama. Fertil Steril 2004; 82: 1-3.
8. Seyhan M. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinde Ocak 2005 Ocak 2011 Tarihleri Arasında Tedavi Gören Hastaların Klinik Gebeliği Üzerine Endometrium, Embriyo Kalitesi, Embriyo Transfer Şekli Gibi Parametrelerin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi.Kayseri: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2012

9. Günaydın G, Tıraş B. İnfertil Hastaya Yaklaşım. İçinde: Çiçek M N, Mungan M T (ed). Klinikte Obstetrik ve jinekoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2007: 89; 869-894
10. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri, Güneş Tıp Kitabevi, 1999.81-100.
11. Kaya S. Yardımlı üreme teknikleri uygulamalarında serviko-vajinal lavaj ve serumdan implantasyon belirteci olarak glikodelin ve makrofaj-koloni stimülan faktör bakılmasının klinik ve prognostik önemi. Uzmanlık Tezi. Ankara:Başkent üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.
12. Yıldırım M. İnsan Anatomisi (5. Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri; 2008; 15-30,Ankara.
13. Junqueira LC, Carneiro J Temel Histoloji, (Onbirinci Baskı. Çev. S. Solakoğlu, Y. Aytakin), Nobel kitabevi;2006; 431- 446, İstanbul.
14. Tekeli A G. Anormal Semen Parametreleri Olan Erkeklerde Semen Analizi ve Semende Mast Hücreleri ile Lökositin Sperm Hareketliliği ve Morfolojisi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Zonguldak: Karaelmas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2011.
15. April EW. NMS Klinik Anatomi, (Çeviri Editörü: Yıldırım M.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 3. baskı, 1998:425-461.
16. WHO Laboratuvar el kitabı, İnsan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi, (Çeviri editörü: Günalp S), Tıp Teknik Kitabevi, 4. baskı, .Ankara 2002:76.
17. Kayıkçı M A, Çam H K, Akman Y & Erol A. Erkek İnfertilitesini Değerlendirmede Semen Analizinin Özellikleri ve Rolü. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Düzce, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2002;4 (3): 35-38
18. Bal M. Samsun Ve Çevresinde Yaşayan Erkek Bireylerde Yaşam Biçiminin Semen Parametreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması.Yüksek Lisans Tezi. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.
19. Dunphy B C, Kay R & Barrat C L R. Quality during the conventional

analysis of semen, an assential exercises, Journal of Andrology, 1998;10: 378-85

20. Koyuncu İ. Varikoselli Hastalarda Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi .Kayseri : Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ,2012.
21. Delilbaşı L. Dn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008; 61-83.
22. Menkveld R, Wong W Y, Lombard C J, Wetzels A M, Thomas C M, Merkus H M & Steegers-Theunissen R. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. Human Reproduction 2001;16(6): 1165-1171
23. Nal E E. İmmunohistokimyasal Olarak DNA Fragmantasyonu Ve Glycodelin Dağılımının Sperm Morfolojisi Ve Hasta Kliniği İle İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.
24. Baker HWG, NG FLH, Liu DY. Preparation and analysis of semen for ivf/gift. In Trounson A, Gardner DK Handbook of Dn Vitro Fertilization, CRC Press 1993; 33-56
25. Buran A. Erkek İnfertilitesinde, Sperm Kaynağına Göre ICSI İşlemi İle Elde Edilen Embriyoların Embriyo İzleme Yöntemi İle Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ,2015.
26. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology: The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod. 2011;26(6):1270–83. doi: 10.1093/humrep/der037
27. Yalçınoğlu ES. PCSI DISHI İle Seçilen Sperm İle Elde Edilen Embriyoların Kalitesi Ve Bunun Gebelik Oranı Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012.

28. Oehninger SC, Kruger TF, ed. Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi. Habitat Tıp Yayıncılık 2009, 97-336.
29. Rizk B, Garcia-Velasco J, Sallam H, Makrigiannakis A. İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri 2008, 478-486.
30. Hamada AJ, Esteves SJ, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. Clinics.2013;68(S1):39-60
31. Popal W, Nagy ZP. Laboratory processing and intracytoplasmic sperm injection using epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve outcomes? Clinics.2013;68(S1):125-130
32. Elzanaty S. Non-obstructive azoospermia and clinical varicocele: therapeutic options. Int Urol Nephrol . 2013;45:669–674
33. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. J Urol. 2002 167(4):1753-6. PMID: 11912403 [PubMed - indexed for MEDLINE]
34. Payne D, Matthews CD. Intracytoplasmic sperm injection--clinical results from the reproductive medicine unit, Adelaide. Reprod Fertil Dev. 1995;7(2):219-27. PMID: 7480840 [PubMed - indexed for MEDLINE]
35. Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. Clinics (Sao Paulo) 2013; 68 (1): 35–8.
36. Esteves SC. Clinical management of infertile men with non-obstructive azoospermia. Asian J Androl. 2015; 17(3):459-70. doi: 10.4103/1008-682X.148719.
37. Weng SP, Surrey MW, Danzer HC, Hill DL, Chen PC, Wu TC. Chromosome abnormalities in embryos derived from microsurgical epididymal sperm aspiration and testicular sperm extraction. Taiwan J Obstet Gynecol. 2014 53(2):202-5. doi: 10.1016/j.tjog.2014.04.014
38. Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:6263e7.

39. Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, Tohda A, Miura H, Nishimura K, et al. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod* 2002;17:2924e9.
40. Doğan SS, Kovalı M., Doğan ÖE, Güleli The effects of prognostic factors on pregnancy success among women 39 years or older having intracytoplasmic sperm injection. *J Turk Soc Obstet Gynecol* 2014;2:78-83
41. Çetinkaya PC., Yelke HK., Basar M., Kahraman S. Impact Of Female Age And Ovarian Reserve On The Outcomes Of ICSI Cycles With Either Fresh Or Frozen-Thawed Testicular Spermatozoa Retrieved From Non-Obstructive Azoospermic Patients. *ASRM Abstracts* 2016;. 106(3).
42. Yarali H, Bozdog G, Polat M, Esinler I, Tiras B. Intracytoplasmic sperm injection outcome of women over 39: an analysis of 668 cycles. *Arch Gynecol Obstet* 2010;281(2):349-54.
43. Sunkara S, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 2011;26(7):1768-74
44. Gill PK, Desai N. Testicular Sperm Can Effect Early Embryo Morphokinetics. *PCRS Abstracts* 2016; 105(2):1-2
45. Tiseo BC, Hayden RP, Tanrikut C. Surgical management of nonobstructive azoospermia. *Asian Journal of Urology* 2015; 2, 85e91.
46. Tüfekçi MA., Başar MM, Atayurt Z., Senel T., Kahraman S. A comparison of ivf outcomes of intracytoplasmic sperm injection using surgically retrieved testicular or frozen-thawed testicular spermatozoa. *The journal of urology_* 2016; 198 4S.
47. Lammers J, Reignier A, Spingart C., David L., Barriere P., Freour T. Does sperm origin affect embryo morphokinetic parameters?. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32:1325–1332.

48. Oehninger S, Chaturvedi S, Toner J, Morshedi M, Mayer J, Lanzendorf K, Muasher S. Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection?. Human Reproduction 1998; 13(8):2161–2164



10.EKLER



T.C.
Istanbul
YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

FEN, SOSYAL VE GİRİŞİMSSEL OLMAYAN SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

04.06.2018

Sayı: 2018/6

İlgi: Etik Kurul Onayı,

Sayın Tuğçe ÇELİK

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurulunun 04.06.2018 tarih ve 2018/6 sayılı toplantı sonucunda "Farklı Sperm Kaynağına Bağlı Olarak İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu Uygulaması Sonuçlarının İncelenmesi" başlıklı çalışmanız Fen, Sosyal ve Girişimsel Olmayan Sağlık Bilimleri Araştırmaları Etik Kurulumuzca UYGUN bulunmuştur.

Araştırmanız süresince çalışmanızda özellikle konu başlığı, gereç ve yöntemler konusu ile ilgili olarak değişiklikler söz konusu olursa tekrar değerlendirilmesi önerilir.

Not: İşbu belge İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen, Sosyal Ve Girişimsel Olmayan Sağlık Bilimleri Araştırmaları Etik Kurul Yönergesi temelinde kaleme alınmıştır.

İş bu belge kurum onayı dahilinde geçerlidir.

Prof. Dr. Emir TAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen, Sosyal Ve Girişimsel Olmayan Sağlık
Bilimleri Araştırmaları Etik Kurulu Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Tuğçe ÇELİK
2. **Doğum Tarihi:** 09.02.1990
3. **Unvanı:** Biyolog/ İlk Yardım Eğitimsi
4. **Öğrenim Durumu:** Yüksek Lisans Öğrencisi

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Süleyman Demirel Üniversitesi	2009-2013
Y. Lisans	Klinik Embriyoloji	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2013-
Ö.Lisans	Sağlık Kurumları İşletmeciliği	Anadolu Üniversitesi	2016-

5. Sertifikalar

- İLK YARDIM EĞİTİCİ EĞİTMENİ, 2014, İstanbul
- DENEY HAYVANLARI KULLANIM, 2012, Isparta
- PCR Çalıştayı, 2011, İstanbul
- YANGIN EĞİTİCİ EĞİTMENİ, 2015, İstanbul
- GLP İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARI EĞİTİMİ, 2015, İstanbul
- GHP İYİ HİJYEN UYGULAMALARI EĞİTİMİ, 2015, İstanbul
- ISO 17025: 2005 LABORATUVAR AKREDİTASYONU, 2015, İstanbul
- ISO 15189 TIBBİ LABORATUVAR AKREDİTASYONU, 2015, İstanbul

İletişim Bilgileri : celikktugce@gmail.com