

T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEKLİSANS PROGRAMI

ERKEK FAKTÖRLÜ İNFERTİL OLGULARDA EMBRİYO
GELİŞİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

KÜBRA KÜTÜKOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: Kübra KÜTÜKOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Kübra KÜTÜKOĞLU tarafından hazırlanan "Erkek Faktörlü İnfertil Olgularda Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LISANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:28/06/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Doç. Dr. Mine ERGÜVEN

İstanbul Aydın Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emre SALABAŞ

Biruni Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin bana ait olduğunu, tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, içinde yer alan bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Kübra KÜTÜKOĞLU

İmza



TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan , başından itibaren en büyük katkıyı ve desteği gösteren saygıdeğer hocam ve değerli danışmanım Prof. Dr. Tülay İREZ'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu sektörde bana her şeyi öğreten, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı çok değerli hocam Bio. Mehmet Seçkin KIRMIT'a ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım Avrupa Şafak Hastanesi Tüp Bebek ekibi ailesine teşekkür ederim.

Tez çalışması Özel Avrupa Şafak Hastanesi Tüp Bebek Merkezi tarafından desteklenmiştir. Eğitim-öğrenim ve tez çalışmam boyunca bana maddi manevi her konuda destek olmuşlardır. Tüm emeği geçenlere sonsuz minnet ve saygılarımı sunarım.

Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan ailem. Hayatım boyunca bana doğruyu ve yanlış ayırt etmeyi öğreten, tüm hayatlarını bana ve kardeşlerime adanmış olan, değeri biçilmeyecek boyuttaki sevgileriyle, sonsuz sabır, özveri, maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili annem Emine BALOTA'ya ve babam Beyazıt BALOTA'ya, benim değerlilerim, sevgili kardeşlerim Tuba BALOTA Elif BALOTA ve Ali Serdar BALOTA'ya sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Güzel dokunuşlarla hayatımızı renklendiren, benim ve oğlumun üzerinde emeği olan desteğini hiç esirgemeyen Meryem KIZILIRMAK'a teşekkür ederim.

Ömrümü yıldızlandırdın, hayata anlam kazandırdın, 2010'dan beri hep yanımda oldun. Hayatımın her aşamasında huzur sağlayan ve bizi yalnız bırakmayan sevgili eşim Oğuz Emre KÜTÜKOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

En değerli varlığım, canım oğlum. Hayattaki şansım, günümü aydınlatanım, en büyük destekçim, her daim yanımda olanım teşekkürlerin en büyüğü sana Mete KÜTÜKOĞLU, iyi ki varsın. Annen seni çok seviyor canım.

Kübra KÜTÜKOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
BEYAN	iii
TEŞEKKÜRLER	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	5
4.1 İnfertilite Tanım	5
4.2. İnfertilite Nedenleri	6
4.2.1.Erkek İnfertilitesi	6
4.2.2.Kadın inferilitesi	6
4.3. Oogenez.....	8
4.4. Folikülogenez	8
4.4.1. Primordial Folikül Evresi.....	8
4.4.2. Primer Folikül	9
4.4.3. Sekonder - Preantral Folikül	10
4.4.5. Antral Folikül.....	11

4.4.6. Preovulatuvar (Graaf) Folikül.....	12
4.4.7. Foliküler Atrezi.....	13
4.5. Oosit – Foliküler Hücre Etkileşimi	14
4.6.Spermatogenez	17
4.7. Sperm.....	18
4.7.1. Spermin yapısı	18
4.7.2. Spermin taşınması.....	19
4.7.3. Sperm Parametreleri	21
4.7.3.1.Semen hacmi	22
4.7.3.2.Sperm motilitesi	22
4.7.3.3.Sperm morfolojisi	24
4.7.4.Semen Analizi ve Değerlendirilmesi.....	25
4.7.4.1.Yıkama ve yüzdürme (swim up) yöntemi.....	25
4.7.4.2.Yoğunluk (gradient) yöntemi.....	25
4.7.5.Embriyo Secim Parametreleri.....	26
4.7.5.1.Embriyo morfolojisinin ışık mikroskobu ile statik değerlendirilmesi	26
4.7.5.2.Preimplantasyon genetik tanı ve tarama	27
4.7.5.3.Taramada metabolik ve proteomik.....	27
4.7.5.4.Hızlandırılmış görüntüleme ile embriyonik gelişimin dinamik değerlendirmesi	28
4.7.6.Bölünme evresi değerlendirilmesi	28
4.7.6.1.Embriyo bölünme hızı.....	28
4.7.6.2.Blastomer büyüklüğü	29
4.7.6.3.Transfer günü secimi.....	29
5.MATERYAL METOD	31
5.1. ICSI protokolleri ve yumurta toplama işlemi.....	31
5.2. ICSI tekniği ile inseminasyon uygulaması	32

5.3.ICSI öncesi hayluronidase enzim uygulaması.....	36
5.4.ICSI uygulaması	36
5.5.Fertilizasyon kontrolü ve ileri embriyo kültürü	37
5.6. İstatiksel Analiz.....	37
6.BULGULAR.....	38
7.TARTIŞMA	41
8. SONUÇLAR	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	59



SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

ALK	Aktivin Reseptörü Benzeri Kinazları
AREG	EGF-Benzeri Peptidlerin - Amfiregulin
AZO	Azoospermi
BMP15	Kemik Morfogenetik Proteini 15
BMPRII	Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü Tip II
BTC	B-Selülinin
cAMP	Siklik AMP
CC	Granülosa Ve Kümüls Hücresel
cGMP	Siklik GMP
COC	Kümüls-Oosit Kompleksi
Cx43	Connexin 43'ün
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EREG	Epiregulin
FISH	Flüoresans İn Situ Hibridizasyonunu
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GDF9	Büyüme Farklılaşma Faktörü 9
Gnrh	Gonadotropin Salgılayan Hormon
ICSI	Mikroenjeksiyon
IVF	İnvitro Fertilizasyon
LH	Luteinize Edici Hormon
MPF	Olgunlaşmayı Arttırıcı Faktör
mRNA	Messenger RNA
NZS	Normozoozpermi
OSF	Oosit Salgılanan Faktör
OZS	Oligozoospermi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDE3	Tip 3 Fosfodiesteraz
PGE2	Prostaglandin E2
PKA	Protein Kinaz A
SMAD	Sma Ve Mad
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZP	Zona Pellucida



TABLO LİSTESİ

Tablo No	Tablo adı	Sayfa No
Tablo 1.	Semen parametreleri referans değerleri	22
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan solüsyonların bilgileri	31
Tablo 3.	Kullanılan malzemelerin bilgileri	32
Tablo 4.	Hastaların demografik verileri	38
Tablo 5.	Gruplara göre ovulasyon indüksiyon sonuçları	39
Tablo 6.	Gruplarda oosit değerlendirmesi.....	39
Tablo 7.	Gruplarda embriyo gelişimi	40
Tablo 8.	Gruplarda sperm parametreleri	40

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Şekil adı	Sayfa No
Şekil 1.	Folikülogenez aşamaları	9
Şekil 2.	Oosit-folikül hücre etkileşimleri	15
Şekil 3.	İnsan Sperm Yapısı Şematik Gösterimi.....	18



1.ÖZET

Bu çalışmada Erkek faktörlü infertil olgularda embriyo gelişiminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Avrupa Şafak Hastanesi Tüp bebek Merkezi'nde tedavi gören ve IVF/ICSI uygulaması yapılan hastalar dahil edilmiştir.

Çalışmada sperm konsantrasyonu açısından farklı olan, 15 mil/ml üzerinde 1501 ve 15 mil/ml altında 407 toplam 1908 olgu bazal parametreler ve embriyo gelişimi ve gebelikler açısından değerlendirildi. Çiftler sperm sayılarına göre 2 gruba ayrılmış (grup 1'de >15mil/mL, grup 2'de ise <15mil/mL) ve buna göre değerlendirmeye alınmıştır.

Siklus öncesi bazal hormon değerleri, kullanılan gonadotropin dozu, ovulasyon indüksiyon süresi ve HCG günü E2 değerleri, ve çiftlerin yaşları açısından gruplar arasında farklılık görülmemiştir. İkinci grupta toplam oosit sayısı ve immatür oosit anlamlı olarak farklı bulundu. Fakat M2 oosit sayısı ve 2PN zigot sayısı benzer olarak saptanmıştır. Embriyo gelişimi ve erken bölünme değerlendirmesinde gelişen Blastokist sayısı sperm konsantrasyonu 15 mil/ml altında bulunan olgularda düşük bulunmuştur. Bölünen embriyo sayısı her grupta benzer bulunmuştur. Sperm parametrelerinden konsantrasyon, motilite ve normal morfoloji ikinci grupta daha düşük bulunmuştur. Buna bağlı olarak gebelik oranları birinci grupta daha yüksek bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: infertilite, erkek infertilitesi, ICSI, embriyo gelişimi

2.ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate embryonic development in male infertile patients. Patients who were treated at Avrupa Şafak Hospital IVF Center and underwent IVF / ICSI were included in the study.

In the study, 1908 cases with a difference of 1501 on 15 mil/mL and 407 to 157 mil/mL, which were different in terms of sperm concentration, were evaluated for basal parameters and embryo development and pregnancies. The couples were divided into 2 groups according to their sperm count (group 1 > 15mil/ mL, in group 2 <15 mil/mL) and were evaluated accordingly.

Pre-cyclic basal hormone levels, gonadotropin dose used, ovulation induction time and HCG day E2 values, mean age of the couples were not different between the groups. The total number of oocytes and immature oocytes were significantly different in the second group. However, M2 oocyte count and 2PN zygote number were similar. The number of Blastocysts in embryo development and early division evaluation were found to be low in patients with sperm concentration less than 15 mil/ml. The number of dividing embryos was similar in each group. Sperm parameters, concentration, motility and normal morphology were lower in the second group. Pregnancy rates were higher in the first group.

Key words: infertility, male infertility, ICSI, embryo development

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre infertilite en az 12 ay boyunca düzenli korunmasız cinsel ilişki denemelerinden sonra klinik bir hamileliğin sağlanamaması ile tanımlanan üreme sistemi hastalığı olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite evli çiftlerin yaklaşık % 15'inde görülür ve vakaların yaklaşık % 30-50'sinde erkek faktörler etkilidir (Tournaye ve Cohlen, 2012).

Semen parametreleri doğrudan erkek kısırlığı ile koreledir. Azospermi, “bir erkeğin santrifüjlenmiş bir semen örneğinin tortusunda“ spermelerin yokluğu ”olarak tanımlanır. Kriptozoospermi, çok düşük spermelerin konsantrasyonu (million1 milyon/mL) olarak tanımlanır. Bu durumlar genellikle rutin bir erkek infertilitesi araştırması sırasında teşhis edilir. Azospermi erkek nüfusunun yaklaşık % 1'inde görülür ve erkek infertilite vakalarında % 20 kadar yüksek olabilir (Jarvi ve ark., 2010). Azospermi ve kriptozoosperminin insidans oranları, genetik farklılıklara, coğrafi bölgelere, yaşa, mesleğe ve erkek partnerin vücut ağırlığına göre farklılık gösterir (Sermondade ve ark., 2012).

Erkek infertilitesi incelemesinde ilk ve temel test standart test semen analizi testidir. Bütün infertil erkeklerin incelemesinde kullanılır. Klasik semen testinde sperm konsantrasyonu, semen volümü, semen Ph, morfoloji, hareketlilik ve semen lökosit sayısı incelenen faktörlerdir. Standart semen testi erkek infertilitesinin incelemesinde genel olarak kullanılmakta, fakat incelenen parametreler infertil olan ve olmayan erkeklerin ayırımında yeterli olmamaktadır. Sperm motilitesi, morfolojisi ve konsantrasyonu erkeklerin fertil seviyelerini belirlemek için kullanılabilir fakat infertilite teşhisi için yeterli olmamaktadır (Sigman ve ark., 2009).

Erkek infertilite nedenleri arasında genetik değişiklikler (Klinefelter sendromu, Y kromozom anomalileri, tek gen hastalıkları), hormonal anormallikler (hipogonadotrofik hipogonadizm), anatomik nedenler veya enfeksiyonlar (orşit), ameliyatlara (travma veya kanser) ve kanser tedavileri (kemoterapi, radyasyon) bulunur (Dohle ve Gert, 2010; Menzies ve ark., 2010).

Sebepler ve görülme sıklığından bağımsız olarak, durum infertilite problemleriyle karşı karşıya kalan birçok çifti etkilemektedir. Yardımcı üreme

teknikleri, özellikle intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), bu çiftler için tek tedavi seçeneğidir. Testiküler sperm ekstraksiyonu metotları ise genellikle azospermi vakalarında ve çoğu sperm hücrelerinin testislerden elde edilen cerrahi biyopsi materyallerinde arandığı kriptozoospermi vakalarında kullanılmaktadır (Karabulut ve ark., 2018).

Bu çalışmada da IVF/ICSI uygulaması yapılan sperm konsantrasyonu açısından farklı olan erkek faktörlü infertil olgularda embriyo gelişiminin ve gebelik açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



4.GENEL BİLGİLER

4.1 İnfertilite Tanım

Kısırlık, korunmasız bir yıllık düzenli ilişkiden sonra doğal olarak gebe kalmama olarak tanımlanır. Subfertilite birincil veya ikincil olabilir. Birincil alt kısırlık, önceden gebeliği olmayan bir çift için gecikmedir. Sekonder subfertilite, daha önce gebe kalmış bir çift için bir gecikmedir, ancak hamilelik, düşük ve ektopik gebelik gibi başarılı olmayabilir (Taylor, 2003).

Gebe kalma şansı, cinsel maruziyetin uzunluğuna, koitus sıklığına ve çiftin yaşına bağlıdır. Normal, genç çiftlerin, 1 aylık korunmasız ilişkiden sonra gebe kalma şansı % 25'tir. Çiftlerin % 70'i 6 ayda ve % 90'ı 1 yıl gebe kalmaktadır. Çiftlerin sadece % 5'i bir buçuk yıl veya iki yıl sonra gebelik yaşamaktadır (Kakarla ve Bradshaw, 2008; Kamel, 2010).

Hem erkek hem de kadınlar sebeplerden eşit olarak sorumludur. İnfertil çiftlerin çoğu, bir erkek faktör, ovulatör disfonksiyon veya tubal-peritoneal hastalık dahil olmak üzere bu üç ana nedenden birine sahiptir. Literatür, vajinismus ve dispareuninin 20-24 yaş arası kadınlarda daha sık olduğunu göstermektedir (Tayebi ve Ardakani, 2009).

Normal fizyolojide, iki gonadotropin hormonu, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) hipofizde üretilir ve salgılanması hipotalamus tarafından salgılanan gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) tarafından kontrol edilir. Yeni bir döngünün başlangıcında, hipotalamus, FSH ve LH'yi serbest bırakmak için hipofiz bezine etki eden GnRH'yi serbest bırakmaya başlar. Bu iki hormon yumurtalığı uyarır ve foliküllerin gelişmesine neden olur. Her ay yaklaşık 30-40 folikül FSH'ye cevaben büyümeye başlar, ancak her ay sadece tek bir olgun yumurta salınır. Bu overden, hipofizden ve hipotalamustan hormon şeklinde mesaj iletimini içerir. Yumurta olgunlaştığında, olgun folikül artan miktarda östrojen salgılar, folikülü kaplayan granuloza hücreleri tarafından üretilir. Baskın folikülün ürettiği östrojen, kana bir östrojen dalgası salıncaya kadar yumurta olgunlaştıkça miktar olarak artar. Yüksek östrojen seviyesi hipofizi büyük miktarda LH salması için uyarır, böylece LH dalgalanmasına yol açar. Bu LH, olgun folikül üzerinde etki eder ve olgun yumurtayı (yumurtlama) yumurtalıkta serbest bırakması için yırtılmasına neden olur (Fraser ve Cooper, 2009).

Testis veya vas deferens olmadan doğan erkekler kısır hale gelebilir. Bazı erkeklerde her iki testis vardır ancak sperm üretememektedirler veya çok az sayıda sperm üretebilirler. Ayrıca, stres libido azalmasına neden olabilir ve çift kısırlığa sahip olabilir.

4.2. İnfertilite Nedenleri

4.2.1. Erkek İnfertilitesi

Erkek kısırılık nedenleri aşağıdaki dört ana kategoriye ayrılmıştır (Anwar, 2016):

Kusurlu Spermatogenez: *Diabetes mellitus* ve hipertiroidizm gibi endokrin bozukluklarının varlığı azospermiye veya yumurtayı dölleme yeteneğine sahip olmayan hatalı spermlerin oluşumuna neden olur. Ayrıca, testis bozukluğu da doğurganlığı etkileyebilir.

Kusurlu Taşıma: Seminal veziküllerin tıkanması veya seminal kanalların bulunmaması, spermlerin hareketliliğini etkileyebilir ve bu nedenle kısırlığa neden olabilir.

Etkili Teslim: İktidarsızlık, ejakülatör fonksiyon bozukluğu, fiziksel sakatlık, hipospadias ve epizpadias gibi psikoseksüel sorunlar erkeklerin verimliliğini etkileyebilir (Anwar, 2016).

4.2.2. Kadın infertilitesi

Kadın kısırlığının nedenleri, kusurlu yumurtlama, taşıma ve implantasyon dahil olmak üzere üç geniş kategoriye ayrılabilir. Bu kategoriler aşağıda daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır (Anwar, 2016).

Hatalı Ovülasyon

Hatalı yumurtlama aşağıdaki nedenlerden dolayı oluşur:

Endokrin bozuklukları: Hipotalamus ve hipofiz bezinin fonksiyon bozukluğu aşırı miktarda prolaktin olmasına neden olabilir, bu yumurtlamayı önleyebilir. Ayrıca, adrenal ve tiroid içeren diğer endokrin bezleri de yumurtlamayı geciktirebilir. Korpus luteum, uterus astarını kalınlaştırmak için gereken yeterli

progesteron üretmediğinde, döllenmiş yumurta implante edemeyebilir ve bu nedenle kısırlığa neden olabilir.

Fiziksel bozukluklar: Obezite, anoreksiya nervoza ve aşırı egzersiz gibi bazı fiziksel bozukluklar aşırı kilo veya yetersiz beslenmeye ve daha sonra adet döngüsüne yol açarak çiftin kısır olmasına neden olabilir (Anwar, 2016).

Over bozuklukları: Polikistik over hastalığı (PKO), artan miktarda testosteron ve LH nedeniyle kısırlığa neden olabilir. Kas, yağ ve karaciğer hücreleri tarafından glikoz alımını azaltabilir ve pankreas tarafından büyük miktarda insülin üretimi ile sonuçlanabilir. Düşük FSH seviyeleri ayrıca yumurtalık foliküllerinden yumurta üretimini engeller ve sonunda bütün yumurtalıkları kaplayan ve gebe kalmayı önleyen sıvı dolu yumurtalık kistlerinin oluşmasına neden olur.

Endometriozis: Bu, uterin astarın bölümlerinin vajina, overlar, fallop tüpleri veya pelvis içine yerleştirildiği bir durumu ifade eder. Bu implantlar her adet döngüsünde büyüyen ve sonunda kabarcıklara ve yaralara dönüşen sıvı dolu kistler oluşturur. Bu izler daha sonra yumurtanın geçişini engeller ve hamileliği geciktirir (Anwar, 2016).

Hatalı Taşıma

Aşağıdakiler, yumurta ve spermelerin hatalı taşınmasına neden olabilir:

Oyum: Pelvik İnflamatuvar Hastalık (PID), belsoğukluğu, peritonit, önceki tüp cerrahisi ve fimbrial adezyonların ortaya çıkması tüp tıkanmasına neden olabilir; Sonuç olarak yumurta serbest bırakılmaz ya da tuzağa düşürülmez, bu nedenle anlayışı geciktirir.

Karın ameliyatından sonra skar dokusu: Karın ameliyatlarından sonra skar dokusu varlığı, yumurtalıkların, fallop tüplerinin ve uterusun hareketini değiştirerek kısırlığa neden olabilir.

Sperm: Vajinismus veya dispareni gibi psikoseksüel sorunların varlığı döllenmeyi engelleyebilir ve çiftin kısır olmasına neden olabilir.

Serviks: Travma, cerrahi, enfeksiyon, servikal mukustaki anti-sperm antikoları da gebeliği geciktirebilir.

Hatalı İmplantasyon

Aşağıdaki nedenlerden dolayı hatalı implantasyon oluşabilir:

Konjenital anomali ve fibroidler: Fallop tüpleri veya serviks yakınındaki bikortnuat uterus ve uterus fibroidleri gibi konjenital uterus anomalileri, zigotun implantasyonunu değiştirebilir ve kısırlığa neden olabilir (Anwar, 2016).

4.3. Oogenez

Yumurtalıktaki oogonia dişi gamet üretimine oogenez denir. Birincil oosit, tek bir yumurta oluşturan, mayoz bölünerek ayrılan diploid hücredir. Her iki mayozun birinden birer iki kutup gövdesi oluşur. Oogenez, ergenlikten menopoza kadar ayda bir kez meydana gelir. Oojenik germ hücrelerine kök hücreler olan ve kendini yenileyerek ovaya farklılaştıran oogonia adı verilir. Embriyonik gelişim sırasında, embriyonun ikinci ila yedinci ayında binlerce oogonia bölünmesiyle kabaca 7 milyon germ hücre üretilir. Birincil oositler oogonia'dan mitozla üretilir. Birincil oositler, embriyonik dönemde ilk mayotik bölümün diploten aşamasına kadar işlenir. Hücre bölünmesi ergenliğe kadar olduğu gibi tutuklandı. Bazı birincil oositler hücre bölünmelerini yaklaşık 50 yıl boyunca tutuklarlar. Primer oositlerin çoğu yaşam boyunca yok edilir ve sonuçta ergenlikten sonra sadece yaklaşık 400 primer oosit gamet haline gelir. Ergenlik, tutuklanan hücre bölünmesini başlatarak birincil oositten ikincil oosit oluşturur. Burada, birincil oosit, eşit olmayan hücre bölünmesi ile bir ikincil oosit ve bir kutupsal gövde üretir. Tüm sitoplazma sekonder oosit tarafından bulunur ve polar gövdenin çekirdeği tahrip edilir. İkincil oosit, yumurtlama sırasında yumurtalıktan salınır (Lakna, 2017).

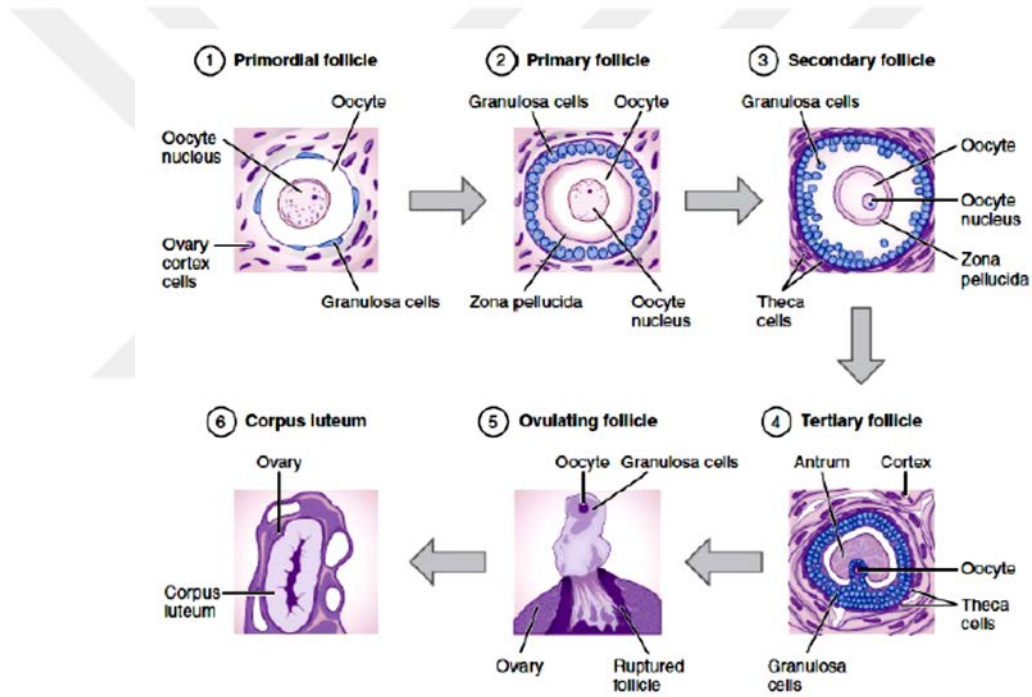
4.4. Folikülogenez

4.4.1. Primordial Folikül Evresi

Bir primordial folikül, düzleştirilmiş granuloza hücrelerinin tek bir katıyla çevrili bir yumurtalık folikülüdür. İdeal olarak, bir yumurtalık folikülünün yumurtlama için uygun olan olgunlaşmış bir folikül haline gelinceye kadar birkaç gelişim evresi boyunca ilerlemesi gerekir. Bu gelişimsel sürece folikülojenez adı verilir ve primordial folikül folikülojenezin ilk aşamasıdır. Yumurtlama, olgun oositin bir yumurtalıktan salınmasıdır. Tipik olarak, bir yumurtalık doğumda belirli sayıda ilkel folikül taşır. Bir primordial folikül, mayozun diploten aşamasında

tutuklanan primer oosit (çapı 25 µm) içerir. Granulosa hücreleri ve bir bazal lamina adı verilen düzleştirilmiş yassı yassı epitel hücrelerinin tek bir katıyla çevrilidir. İdeal olarak, insan primordial folikülünün çapı 0.03 mm'dir. Primordial foliküllerin bağımsız bir kan kaynağı olmadığından, endokrin sisteme daha az maruz kalırlar.

İlkel bir folikülün gelişiminin yeniden başlatılması sürecine ergenlik döneminde başlayan ilk işe alım denir. Primordial foliküller yaşam boyunca over foliküllerinin çoğunluğudur. İlkel foliküllerin ilk alımı, yaşam boyunca sürekli dir. İlk işe alımın ilk gözle görülür işareti, granulosa hücrelerinin skuamözden küboidale değişmesidir. Primordial folikülün 8 granülosa hücresi 19'a ulaşır (Lakna, 2017).



Şekil 1. Folikülogenez aşamaları

4.4.2. Primer Folikül

Bir primer folikül, oositi çevreleyen tek bir tabaka halinde düzenlenen bir veya daha fazla cuboidal granulosa hücrelerinin varlığı ile tanımlanır. Primer folikülde meydana gelen ana gelişimsel olaylar FSH reseptörü ekspresyonu ve oosit büyümesi ve farklılaşmasını içerir. Granulosa hücreleri primer folikül evresinde FSH reseptörlerini eksprese etmeye başlar (Oktay ve ark., 1997). FSH reseptörü ekspresyonunun uyarıcıları arasında FSH'nin kendisi, aktivin, siklik AMP ve TGF bulunur (Findlay ve Drummond, 1997). Her ne kadar folikül alımı ve folikül

büyümesinin ilk aşamaları gonadotropinlerden bağımsız olsa da, primer folikül gelişimi için preantral aşamada FSH gereklidir (Oktay ve ark., 1998). Hayvanlarda, yüksek seviyelerde plazma FSH, primer folikül gelişimini hızlandırır (Fortune ve ark., 2000). Bu, kadınlarda FSH'deki yaşa bağlı monotropik artışın primer foliküldeki olayları etkileyebilme olasılığını artırır.

Birincil folikül gelişimine oositteki çarpıcı değişiklikler eşlik eder. Preantral dönemde oosit, çapı ~ 25 um ila ~ 120 um arasında artar ve çevresindeki hücre dışı matris olan zona pellucida'yı (ZP) geliştirir. Bu muazzam büyüme, oosit genomunun yeniden aktivasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Büyüme fazı boyunca, oosit yüksek derecede transkripsiyonel olarak aktiftir, çünkü oosit olgunlaşması, döllenmesi ve erken embriyo gelişimi için kritik süreçlerin yanı sıra kendi büyümesini desteklemek için yeterli proteinler ve mRNA transkriptleri üretmesi gerekir. Bazı oosit transkriptleri hemen tercüme edilir ve ortaya çıkan proteinler devam eden oosit büyümesine ve farklılaşmasına katkıda bulunurken, gelecekteki gelişim süreçleri için gerekli olan diğerleri daha sonra çeviri için saklanır (Choi ve Rajkovic, 2006).

Birincil folikül gelişiminde önemli bir olay oosit ve granülosa hücreleri arasındaki yakın hücre içi bağlantıların geliştirilmesidir (Albertini ve ark., 2001). Hem oosit hem de granülosa hücreleri, difüzyon için son derece geniş bir yüzey alanı oluşturmak için birbiriyle iç içe geçmiş çok sayıda sitoplazmik çıkıntı ve mikrodamarlar hazırlamaktadır. Ek olarak, folikül hücresi mikrodamarlarının ve sitoplazmik çıkıntılarının bazıları, oosit plazma zarının yayılması yoluyla zaman zaman nükleer membrana yaklaşarak fiziksel olarak oositin derinliklerine nüfuz eder. Yapışkan bağlantılardan ve boşluk bağlantılarından oluşan hücre-hücre temasları bu bölgelerde kurulur. Connexins adı verilen proteinlerden oluşan hücreler arası kanallar olan boşluklar, iyonların, metabolitlerin ve sinyal moleküllerinin difüzyonuna izin veren bitişik hücreleri doğrudan birleştirir (Makabe ve ark., 2006).

4.4.3. Sekonder - Preantral Folikül

İkincil folikül gelişimi sırasında meydana gelen ana değişiklikler arasında, oosit çevresinde çok sayıda katman oluşturan artan sayıda granülosa hücresi birikimi bulunur. Bir primerin tamamen büyümüş bir sekonder folikül için gelişimi, oosit

tarafından üretilen büyüme faktörlerini içeren aktif bir otokrin / parakrin düzenleme sürecinden kaynaklanır.

İkincil folikül gelişimi, ikinci katman granuloza hücrelerinin edinimi ile başlar. Bu adım, birincil-ikincil folikül geçişi olarak adlandırılır. Granuloza hücrelerinin düzeninde basit cuboidal epitelden tabakalı veya psödostratize kolumnar epiteline değişiklik yapılmasını içerir. Hayvanlarda yapılan deneyler, primer / sekonder evrenin folikülojenez sürecinde kritik bir düzenlenmiş adım olduğunu, örneğin, GDF-9 ve BMP-15 yokluğunda sırasıyla farelerde ve koyunlarda folikül büyümesi ve gelişimi durduğunu göstermiştir (Araújo ve ark.,2014).

Sekonder folikül gelişimi aynı zamanda thecal gelişme ile karakterizedir. Primer / sekonder geçiş zamanında veya yaklaşık olarak bazal lamina çevresinde birkaç stromal benzeri hücre tabakası belirir. Sığıçında, bu hücrelerin bazıları, farklılaşmış on hücrelere, yani BMP-4'e yönelik yeni bir fonksiyonel markeri eksprese eder. Bu önemli bir bulgu olup folikülojenezde, yani birincil / ikincil geçiş aşamasında çok erken geliştiğini gösterir (Araújo ve ark.,2014).

Oosit, preantral folikülojenez sırasında büyümesini tamamladığında, folikül ortamından çıkarılırsa kendiliğinden mayozise devam edecektir. Bununla birlikte, tamamen büyümüş oositler folikülojenez sırasında nadiren mayiyozu sürdürür. Bu, folikül hücreleri tarafından lokal olarak kontrol edilen bir mayotik inhibe edici mekanizmanın var olduğu kavramına yol açmıştır. Siklik AMP'nin mayozun devam etmesini engellemede kritik bir rolü olduğuna dair geniş kanıtlar vardır (Araújo ve ark.,2014).

4.4.5. Antral Folikül

Bir antral folikül, foliküler sıvı olarak adlandırılan sıvı içeren bir boşluk veya “antrum” ile karakterize edilir. Foliküler sıvı, oosit ve granuloza hücrelerinden salgılayan ürünlerle şartlandırılan bir plazma eksüdasıdır. Granuloza hücrelerinin ve oositlerin bulunduğu ve düzenleyici moleküllerin bu mikroçevreye gidip gelmek zorunda oldukları ortamdır. Antrum gelişiminin başlangıcı, oositin bir kutbunda sıvı dolu bir boşluğun ortaya çıkması ile karakterize edilir. Laboratuvar hayvanlarında, folikülün kendisi tarafından eksprese edilen iki protein, antrum formasyonu, yani granuloza türevi kit ligand ve oosit Cx37 için esastır. Bu proteinlerden herhangi biri mevcut değilse, o zaman hiçbir antral folikül gelişmez (Yu ve ark., 2005)

Antrum oluşumlarından sonra, antral folikülün temel planı oluşturulur ve çeşitli hücre tipleri, kademeli büyüme ve gelişmeye yol açan uyarınları bekleyen uygun pozisyonlarında bulunur. Bir antral folikül, insan yumurtalıklarında çapı 0.4 ila ~ 25 mm olarak ölçen nispeten büyük foliküllerin heterojen ailesinin bir üyesidir (Ng ve ark., 2005). Antral foliküllerin yapısı ve organizasyonu, büyük bir büyümeye rağmen ve adet döngüsünün aşamasına bakılmaksızın esasen aynı kalır. Bir antral folikülün genel ebadı, büyük ölçüde, daha sonra foliküler sıvının hacmine göre belirlenen antrum ebadına göre belirlenir. Folikül boyutuna bağlı olarak, foliküler sıvının hacmi 0.02 ila 7 ml arasında değişir. Folikül hücrelerinin çoğalması folikül boyutuna da katkıda bulunur. Baskın bir folikülde, granuloza ve on hücre, antrumun foliküler sıvı ile dolması ile birlikte yaygın olarak çoğalır. Bu nedenle, artmış foliküler sıvı birikimi ve hücre proliferasyonu, döngünün foliküler fazında baskın folikülün muazzam büyümesinden sorumludur. Atretik folikülün boyutunu sınırlayan foliküler sıvı oluşumunun ve mitozun kesilmesidir. Bir atretik folikül genellikle küçük ila orta evre (1-10 m) ötesinde gelişemez. Antral foliküllerin ve boyutlarının nispi bolluğu, yaş ve adet döngüsünün bir fonksiyonu olarak değişir. Bir kadının yumurtalıklarında adet döngüsünün başlarında bulunan toplam antral folikül sayısı, yumurtalık rezervinin bir göstergesi gibi görünmektedir. Bu “antral folikül sayısı” ultrason ile belirlenebilir ve infertil kadınlarda uygun tedavi protokollerini belirlemek için klinik olarak kullanılmıştır (Broekmans ve ark., 2010).

4.4.6. Preovulatuvar (Graaf) Folikül

Granuloza hücrelerinde devam eden proliferasyon ve devam eden likör folikülü oluşumu olgun folikül olarak da bilinen Graaf folikülü oluşumu ile sonuçlanır ve ovulasyon esnasında yaklaşık 2,5cm büyüklüğe ulaşabilir (Gartner ve Hiatt, 2006). Folikül maksimum büyüklüğüne yaklaştıkça granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi düşer. Ovulasyona hazırlanmak için granuloza hücrelerinin arasında boşluklar oluşur. Oositin etrafındaki korona radiata hücreleri ve bunlara zayıf şekilde tutunmuş olan kumulus hücreleri ovulasyonda oositle birlikte kalırlar. Bu dönemde teka interna hücre sitoplazmasında lipid damlacıkları görülmeye başlanır ve ultrastrüktürel olarak tipik steroid sentezleyen hücre görünümü kazanırlar (Ross ve Pawlina, 2011).

4.4.7. Foliküler Atrezi

Foliküler atrezi folikülün yırtılma veya yumurtlamadaki başarısızlığını ifade eder. Daha genel olarak, foliküler atrezi, yumurtlama hedefleri haricindeki tüm foliküllerin ölümünü kapsar.

Çalışmaların çoğu erişkin overde foliküler atreziye odaklanırken, süreç fetal overde ve doğumdan sonra da baskındır. Folikül oluşum zamanından önce ve gelişmekte olan over içinde kurulduktan sonra, ilkel germ hücreleri oogoniaya dönüşür. Oogonia çoğalmaya devam ederken, aynı zamanda geniş çaplı apoptotik ölümlere de maruz kalır. Gebeliğin ortalarında oogonia, mayozise giren, ancak daha sonra dictyate aşamada oositlere dönüşüme uğrar. Bu aynı zamanda, oositlerin ilkel foliküller oluşturmak üzere granuloza hücreleriyle çevrelendiği dönemdir. İnsan dışı fetüsünde, en yüksek oosit sayısına gestasyonun ortasına ulaşılır (~7 milyon hücre), ancak gebeliğin son yarısında, bunların en az üçte ikisi kaybolur ve 1 ila 2 milyon rezerv bırakır. Bu büyük germ hücrelerinin kaybı, tüm gelişim aşamalarında bu hücrelerin apoptozisinden kaynaklanmaktadır (Baker, 1963; Forabosco ve ark, 1991). Oosit yıpranması folikül oluşumundan önce doğum öncesi olarak da görülür. Germ hücrelerinin kaybı doğum sırasında sonlanmaz. İnsanda, ergenlik döneminde % 75 oranında oosit kaybı vardır (Baker, 1963).

Doğum öncesi durumun aksine, doğum sonrası oosit tükenmesi folikül atrezisi tarafından meydana gelir. Foliküler gelişim, çocukluk boyunca karakteristik olarak dinamiktir, ergenlikteki folikül rezervinin büyüklüğü, foliküler durgunluk, büyüme veya atrezinin dinamik sonuçlarının bir yansımasıdır (Tingen ve ark., 2009).

Foliküler atrezi foliküler gelişimin tüm aşamalarını etkiler, ancak atretik hale gelen foliküllerin oranı artmış folikül büyüklüğü ile artar. Doğal döngülerde, küçük antral foliküller özellikle atreziye eğilimlidir (Gosden ve Spears, 1997; Hirshfield, 1991; Kaipia ve Hsueh, 1997). Foliküler atrezi, oositlerin dışının üreme hayatı boyunca yumurtlama için hazır kalmasını sağlamak için sıkı kontrol altında olduğunu gösterir.

4.5. Oosit – Foliküler Hücre Etkileşimi

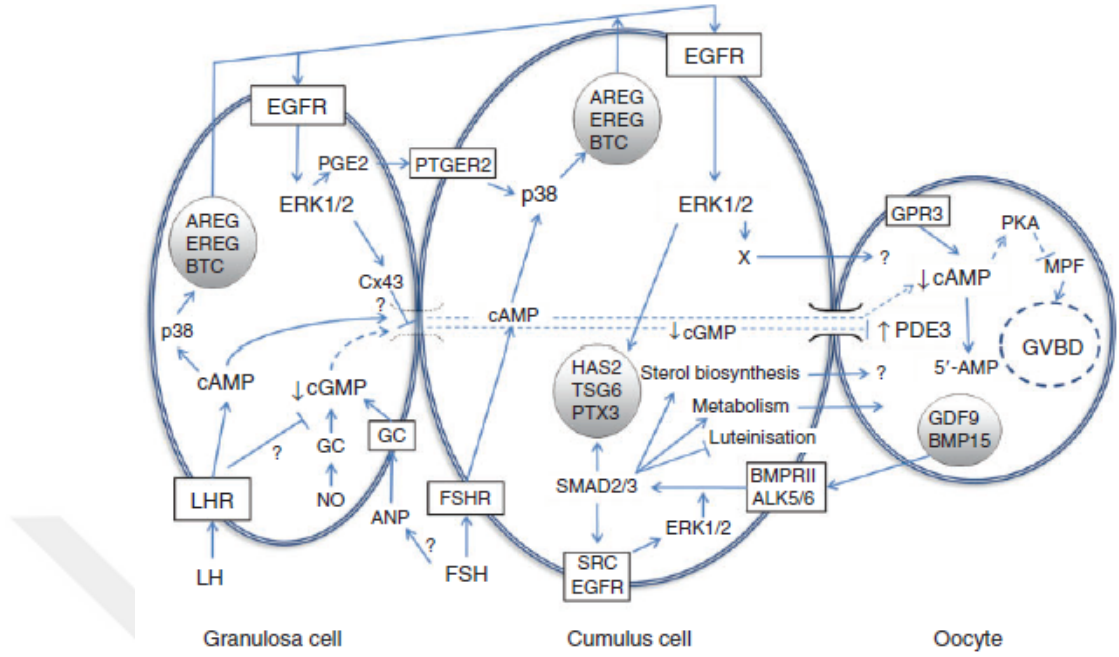
Granülosa ve cumulus hücre fonksiyonunun oosit kontrolü

Yumurtalık ve oosit biyolojisinde son on yılda ortaya çıkacak önemli bir yeni paradigma, oosit salgılanan faktör (OSF) folikülojenez regülasyonu kavramıdır (Eppig 2001; Gilchrist ve ark. 2004, 2008; McNatty ve ark. 2006; Scaramuzzi ve ark. 2010). Oositler, çözünür parakrin büyüme faktörlerinin üretimi yoluyla granülosa hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenler. En önemli iki OSF, büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9) ve kemik morfogenetik proteini 15'tir (BMP15) (Galloway ve ark. 2000).

Oosit salgılanan GDF9 ve BMP15 Sma ve Mad ile ilgili (SMAD) hücre içi sinyal transdüserlerini aktive etmek için, granülosa ve kümülüs hücreleri (CC'ler) üzerinde reseptörleri, kemik morfogenetik protein reseptörü tip II (BMPRII) ve aktivin reseptörü benzeri kinazları (ALK'lar) üzerinde bir parakrin modda etki eder (Kaivo-oja ve ark. 2006). Bu ligandların, reseptörlerin veya ikinci habercilerin herhangi birinin ifadesi, yüksek türe özgü bir şekilde sterillik, gelişmiş verim veya over hastalığına neden olur (McNatty ve ark. 2004).

OSF'lerin folikülojenezin antral fazı sırasındaki temel fonksiyonunun, granülosa hücrelerinin kümülüs hücrelerine farklılaşmasını yönlendirmek ve folikülde bu farklı fenotipi korumaktır (Li ve ark., 2000). Bu, oosit kaynaklı bir lokalize konsantrasyon veya morfogenetik gradyan oluşturan OSF'ler tarafından başarılmış gibi görünmektedir (Hussein ve ark. 2005). OSF sinyallerinin kümülüs hücre fonksiyonuna sonuçları çoktur (Gilchrist ve ark. 2008) ve bu aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. OSF'lerin CC'ler üzerindeki etkilerinden bazıları, luteinizasyonun inhibisyonu (Li ve ark. 2000), enerji metabolizmasının düzenlenmesi (Sutton ve ark., 2003; Sugiura ve ark. 2005), sterol biyosentezi (Su ve ark. 2008), CC genişlemesinin düzenlenmesi, büyüme ve ölüm önlenmesinin uyarılmasını içerir (Gilchrist ve ark. 2001, 2006; Hussein ve ark. 2005). OSF'ler vasıtasıyla, oosit, oositin düşük kapasiteye sahip olduğu fonksiyonları yerine getirmesi için CC'leri yönlendirmektedir (Sutton-McDowall ve ark. 2010).

Son zamanlarda yapılan iki çalışma, OSF ile CC'lerde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyalleşmesi arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir (Sasseville ve ark. 2010; Su ve ark. 2010).



Şekil 2. Oosit-folikül hücre etkileşimleri

Bir süredir oosit kaynaklı sinyaller ile CC'lerde keşişen folikülden gelen sinyaller arasında önemli bir etkileşim olduğu bilinmektedir. Bu başlangıçta, kümülüs-oosit kompleksi (COC) genişlemesi için OSF'ler ve FSH için gereklilik gösterilmiştir. Daha sonra, foliküler sinyalin CCS'de ERK1 / 2 aracılık ettiği, FSH veya epidermal büyüme faktörü ile aktive edilebildiği (Su ve ark. 2002, 2003) ve oosit parakrin sinyalinin GDF9 / BMP15 aktifleştirici aracılı olduğu gösterilmiştir (Dragovic ve ark., 2007; Yoshino ve ark., 2006; Diaz ve ark., 2007). Son zamanlarda, bu iki yol arasında granulosa ve cumulus hücrelerinde GDF9 – SMAD3 sinyalini mümkün kılan EGFR – ERK1 / 2 yolu aracılık ettiğini göstermiştir (Sasseville ve ark. 2010). Buna, ERK1/2'nin EGFR ile aktivasyonuna aracılık eder. Bunun sonucunda SMAD3'ü, bağlanma bölgesinde SMAD2 / 3- aracılı gen transkripsiyonu ile fosforile eder. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışma, oositlerin, GDF9/BMP15 sinyalleşmesi yoluyla CC'lerde EGFR ekspresyonunu desteklediğini göstermiştir (Su ve ark. 2010). Bu nedenle, CC'lerde GDF9 / BMP15 – SMAD2/3 ve EGFR-ERK1/2 sinyalleri arasında GDF9/BMP15 – SMAD2/3 ile

EGFR-ERK1/2 sinyalleri arasında karmaşık, karşılıklı bağımlı etkileşimler olduğu ve bunların oosit-somatik iletişimin bağında olduğu görülmektedir. Oosit ve onun destekleyici somatik hücreleri arasındaki bu ooteregülatuar döngü oosit gelişimi için çok önemli olabilir.

Oosit olgunlaşmasının foliküler kontrolü

Oosit olgunlaşmasının folikül hücre kontrolü açısından, son birkaç yılda anlayışta önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Preovülator LH dalgalanmasının oosit olgunlaşmasına neden olduğu uzun zamandır bilinmekle birlikte, bu süreci düzenleyen tam moleküler mekanizmalar on yıllardır tartışma konusu olmuştur. Bir oosit meiyotik düzenleme ve sürdürme aracı, oosit içinde yapısal olarak aktif G-protein-eşli reseptörler (Mehlmann ve ark., 2002) tarafından sentezlenen ve ayrıca oosite mural granülosa tarafından tedarik edilen siklik AMP'dir (cAMP). Yüksek oosit içi cAMP seviyeleri, cAMP-bağımlı protein kinaz A'yı (PKA) uyararak olgunlaşmayı artırıcı faktör (MPF) aktivitesini baskılayarak oositleri meiyotik olarak tutar. Oosit, cAMP'yi parçalayan enzim olan güçlü bir tip 3 fosfodiesteraz (PDE3) içerir (Tsafiri ve ark. 1996). Önemli olarak, folikülün somatik hücreleri ayrıca PDE aktivitesini inhibe eden oosite (Tornell ve ark., 1991) siklik GMP (cGMP) sağlar. Oosit içerisindeki cAMP'nin paradoksu, yüksek seviyelerin folikülojeniz boyunca mayotik tutmayı sürdürdüğü, ancak gonadotropinlerin mitotik indükleyici etkilerine aracılık ettiğidir. Bu, cAMP içindeki geçici bir etkinin bir mayoz oluşturucu sinyal ürettiği fikri ile açıklanabilir (Downs ve Chen 2008). Son zamanlarda yapılan iki önemli çalışma, over gonadotropin dalgalanmasının, foliküler ve oosit cGMP seviyelerinde, oosit PDE aktivitesinde artışa neden olan, intraokosit cAMP ve meiyotik yeniden başlamasında düşüşe neden olan, oosit PDE aktivitesinde bir düşüşe neden olduğunu göstermiştir (Norris ve ark. 2009; Vaccari ve ark. 2009).

İkinci büyük yeni buluş, preovülator LH dalgalanmasının, folikülün somatik hücrelerinde preovülator LH dalgalanmasının, EGF-benzeri peptidlerin - amfiregulin (AREG), epiregulin (EREG) ve b-selülinin (BTC) hızlı bir sekonder kaskadı oluşturmasıdır (Park ve ark., 2004). Bu peptitler başlangıçta LH'ye cevaben MGC'ler tarafından üretilir ve EGC reseptörleri vasıtasıyla MGC'ler ve CC'ler üzerindeki parakrin etkileri üzerinde ootokrin etkiler gösterir. Ortaya çıkan önemli bir kavram, EGF reseptörünün, yumurtlama LH sinyalini, granülosa hücrelerinden, kümülüs

hücreleri boyunca oosite yaymada merkezi bir bağ olmasıdır (Reizel ve ark., 2010). Merkezi MGC / CC sinyal iletimi, EGF reseptörünü aktive eden EGF benzeri peptitlerdir (Park ve ark. 2004; Fan ve ark. 2009). ERK1/2'nin aktivasyonu, bir sıra prostaglandin E2 (PGE2) ve p38MAPK indüksiyonunu indükler, bu da MGC'ler ve CC'ler tarafından EGF benzeri peptid üretimini arttırır (Park ve ark., 2004; Ashkenazi ve ark., 2005; Shimada ve ark., 2006; Downs ve Chen 2008). EGF benzeri peptitler, ERK1/2 gerektiren bir mekanizma yoluyla oosit meiotik yeniden başlatılmasının güçlü indükleyicileridir (Fan ve ark., 2009).

Kümüls hücreleri ERK1 / 2 ile indüklenen mayotik yeniden başlatmanın detayları henüz tam olarak tanımlanmamıştır, ancak granülosa kümülüs aralığı mekanizmasının kapanmasına yol açan connexin 43'ün (Cx43) fosforilasyonunu (Sela-Abramovich ve ark., 2005), daha sonra foliküler cAMP ve cGMP'nin inhibe edici etkilerinin kaybı (Sela-Abramovich ve ark. 2006; Norris ve ark. 2009) veya alternatif olarak, CC'ler tarafından uyarıcı bir mayoz oluşturucu faktörün üretimi veya bunların ikisinin bir kombinasyonunu içerebilir.

4.6.Spermatogenez

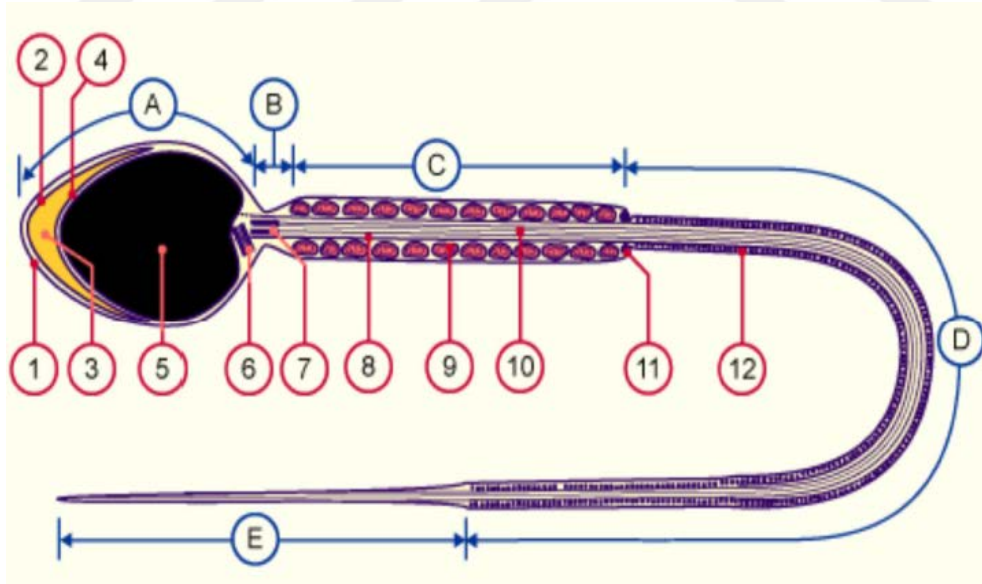
Erkek gametlerin (spermlerin) testiste spermatogoniadan üretilmesine spermatogenez denir. Spermatogonium, diploid hücrelerden oluşur. Erkeklerde primer üreme organı olan testisin minik tüplerinde bulunur. Her spermatogonium, dört haploid spermatozoanın üretiminden sorumludur. Hücre bölünmesi mayoz nedeniyle oluşur. Spermatogenezis, erkeklerin ergenliğiyle başlar. Spermatojenik germ hücrelerine spermatogonia denir. Spermatogonia kendini yenileyebilen kök hücrelerdir. Spermatozoa'ya farklılaşmayı taahhüt eden ara spermatogonium'a farklılaşırlar. Ara spermatogonium'un mitozu, daha fazla mitoz geçiren ve primer spermatozoid üreten B tipi spermatogonyaya üretir. Birincil spermler daha sonra iki sekonder sperm üreterek mayoz I'e maruz kalır. Elde edilen haploid hücreler, testis lümeninin sınırına sitoplazmik köprüler vasıtasıyla bağlı olan spermatidler olarak adlandırılır. Spermatidler yuvarlak, işaretlenmemiş hücrelerdir, spermiogenez sırasında olgunlaşır ve spermlere farklılaşırlar. İnsan spermatik gelişimi süreci tamamlamak için yaklaşık 70 gün sürer. Günde insanlarda testisler tarafından 100 milyon sperm üretilir (Lakna, 2017).

4.7. Sperm

4.7.1. Spermin yapısı

Olgun evreye geçmiş ve dölleme yeteneğine sahip olan sperm; serbest olarak yüzebileen, baş ve kuyruktan oluşan hareketli hücre olarak tanımlanmaktadır. Spermde baş ve kuyruğun birleştiği bölgeye boyun adı verilmektedir. Spermin en büyük bölümü, baş kısmıdır ve haploid 16 nükleus içermektedir. Nükleusun 2/3 ön kısmı akrozomla kaplıdır ve şapka görünümünde olan bu keseye benzeyen yapı enzimleri içerir. Burada bulunan enzimlerden en önemlisi akrozindir. Bu enzimler salındığında spermın fertilizasyon sırasında korona radiata ve zona pellusidayı geçmesi kolaylaşmaktadır (Moore, 2009; Candan, 2017).

Spermde kuyruğu orta, esas ve son olmak üzere üç parçadan meydana gelmektedir. Kuyruk spermın hareketini sağlar ve fertilizasyonun gerçekleşeceği bölgeye hareket ettirmektedir. Kuyruğun orta parçasında bulunan mitokondriler hareket için gerekli olan ATP'yi üretir (Moore, 2009). Spermın kuyruk ölçüleri 45 µm uzunluğunda ve 0.4-0.5 µm çapındadır (Ford, 2010). Ergin haldeki spermın morfolojik özellikleri Kruger kriterleri ve WHO kriterleri ile belirlenmiştir.



Şekil 3. İnsan Sperm Yapısı Şematik Gösterimi

A. Baş, B. Boyun, C. Ara parça, C/E. Kuyruk, D. Esas parça, E. Kuyruk son parça. 1. Pazma membranı 2. Dış membran 3. Akrozom 4. İç akromozal membran 5. Nükleus 6. Proksimal sentriol 7. Distal sentriol 8. Dış yoğun lif 9. Mitokondri 10. Aksonem 11. Annulus (Biçeroğlu, 2017)

4.7.2. Spermin taşınması

Sperm taşınması, hem erkek üreme sisteminde hem de dişi üreme sisteminde meydana gelir. Erkek üreme sisteminde spermatozoanın taşınması yapısal ve fonksiyonel olgunlaşması ile yakından ilişkilidir, oysa kadın üreme sisteminde spermatozoanın yumurtayı bulabileceği üst uterus tüpüne geçmesi önemlidir (Bruce ve Carlson, 2014).

Seminifer tübüllerde spermiyogenezden sonra, spermler morfolojik olarak olgundur, fakat bir yumurtayı dölleme yeteneğine sahip değildir. Spermatozoalar, testis sıvısı aracılığıyla, seminifer tübüllerden, epididimisin kapağına (baş) efferent duktüllerle aktarılır. Bunlar, seminifer tüplerde üretilen sıvı basıncı ile tahrik edilir ve kanallardaki düz kas kasılmaları ve siliyer akımlarla desteklenir. Spermatozoa, epididim kanalında yaklaşık 12 gün geçirir. Bu olgunlaşma dönemi, sperm başının plazma zarındaki glikoproteinlerdeki değişikliklerle ilişkilidir. Spermatozoa, epididiminin kaudasına (kuyruğuna) ulaştığında, bir yumurtayı dölleme yeteneğine sahiptir (Bruce ve Carlson, 2014).

Boşalmada spermatozoa, duktus deferens'den hızla geçer ve seminal veziküllerden ve prostat bezinden gelen sıvı salgıları ile karışır. Prostatik sıvı sitrik asit, asit fosfataz, çinko ve magnezyum iyonları bakımından zengin, seminal vezikül sıvısı ise fruktoz (spermatozoanın başlıca enerji kaynağı) ve prostaglandinler bakımından zengindir. 2 ila 6 mL ejakülat (semen veya seminal sıvı) tipik olarak seminal veziküllerden (toplamın% 60'ı) alkalın sıvıyla karıştırılan 40 ila 250 milyon spermatozoa ve prostattan (% 30) asit sekresyonu (pH 6.5) içerir. Normal semen pH'ı 7,2 ile 7,8 arasında değişmektedir. Normalde ejakülatta bulunan çok sayıda sperm (> 100 milyon) olmasına rağmen, ejakülat başına 25 milyon spermatozoa kadar küçük bir sayı fertilité ile uyumlu olabilir (Bruce ve Carlson, 2014).

Dişi üreme sisteminde, sperm taşınması üst vajinada başlar ve spermlerin yumurta ile temas ettiği uterus tüpünün ampulla kısmında biter. Kopulasyon sırasında, seminal sıvı normalde üst vajinaya bırakılır, burada kompozisyonu ve tamponlama kapasitesi spermatozoayı hemen üst vajinal bölgede bulunan asit sıvısından korur. Asidik vajinal sıvı normalde servikal kanalı patojenik organizmalardan korumada bakterisit bir işlev görür. Yaklaşık 10 saniye içinde, üst vajinanın pH'ı 4,3'ten 7,2'ye çıkarılır. Tamponlama etkisi insanlarda sadece birkaç

dakika sürer, ancak spermelerin sperm hareketliliği için optimal olan bir ortamda (pH 6.0 ila 6.5) servikse yaklaşması için yeterli zaman sağlar (Bruce ve Carlson, 2014).

Sperm hücrelerinin aşması gereken bir sonraki engel servikal kanal ve onu tıkayan servikal mukustur. İntravajinal basınçtaki değişiklikler spermatozoayı servikal os içine çekebilir, ancak yüzme hareketleri de spermatozoanın servikal mukusa nüfuz etmesinde önemli gibi görünmektedir (Bruce ve Carlson, 2014).

Servikal mukusun kompozisyonu ve viskozitesi, adet döngüsü boyunca önemli ölçüde değişir. Servikal müsin ve çözünen bileşenlerden oluşan servikal mukus, kolayca nüfuz edilemez. Bununla birlikte, döngünün 9 ve 16. günleri arasında, su içeriği artar ve bu değişiklik, sperm yumurtlama süresi boyunca rahim ağzından geçişini kolaylaştırır; Böyle mukus bazen E mukus denir. Yumurtlamadan sonra, progesteronun etkisi altında, sulu servikal mukus üretimi durur ve su içeriği az olan yeni bir tip yapışkan mukus üretilir. Bu progestasyonel mukus, bazen G mukus denir, sperm penetrasyonuna neredeyse tamamen dirençlidir. Çok etkili bir doğal aile planlaması yöntemi servikal mukusun özelliklerinden yararlanır (Bruce ve Carlson, 2014).

Servikte iki ana sperm taşıma modu vardır. Bunlardan biri, bir miktar spermatozoanın uterus tüplerine 5 ila 20 dakikalık boşalma içinde ulaşabileceği, başlangıçtaki hızlı taşıma aşamasıdır. Bu tür hızlı taşıma, dişi üreme sisteminin kas hareketlerine, spermatozoanın hareketliliğinden daha fazla dayanır. İkinci yavaş sperm taşıma aşaması, spermelerin servikal mukustan (2 ila 3 mm / saat hızda hareket ederek) yüzmesini, servikal kraklarda depolanmasını ve servikal kanaldan en az 2 ila 3 arasındaki son geçişlerini içerir (Bruce ve Carlson, 2014).

Spermatozoanın uterus boşluğu içinden geçişi hakkında nispeten az şey bilinmektedir, ancak sperm hareketinden ziyade uterus düz kasının kasılması ana intrauterin nakil mekanizması gibi görünmektedir. Bu noktada, spermeler uterus tüplerinden birine girer (Bruce ve Carlson, 2014).

Uterin tüpün içine girdikten sonra spermatozoa, isthmusta toplanır ve yaklaşık 24 saat boyunca epiteli bağlanır. Bu süre zarfında, kapasitasyon reaksiyonundan geçmesi için tüpün salgılarından etkilenirler. Kapasitasyonun bir aşaması, kolesterolün sperm yüzeyinden uzaklaştırılmasıdır. Kolesterol, bir semen

bileşenidir ve erken kapasitasyonu engellemeye çalışır. Bir sonraki kapasitasyon aşaması, epididimde görev süreleri sırasında spermatozoa yüzeyinde biriken birçok glikoproteinin uzaklaştırılmasını içerir. Spermatozoanın bir yumurtayı döllemesi için kapasite gereklidir. Kapasite reaksiyonundan sonra, spermatozoa bir hiperaktivite süresine maruz kalır ve tubal epitelinden ayrılır. Hiperaktivasyon spermatozoanın onları tubal epiteli tutan bağlardan arındırmasına yardımcı olur. Ayrıca spermin nüfuz eden isitmik mukusta olduğu kadar kova radiata ve ovumu çevreleyen zona pellucida'da da yardımcı olur. Belirli bir zamanda yalnızca az sayıda sperm salınır. Bu, polispermi şansını azaltabilir (Bruce ve Carlson, 2014).

Spermatozoa, isthmustan salınmaları üzerine, tüpün kas hareketlerini ve bazı yüzme hareketlerini bir araya getirerek tüpü yukarı doğru ilerletir. Bir yumurtanın ve spermatozoanın tüpe kadar eşzamanlı taşınması, uterus tüp kaslarının peristaltik kasılmaları temelinde açıklanmaktadır. Bu kasılmalar tüpü bölmelere ayırır. Belirli bir bölmede, gamet, 1-2 günden fazla bir süre yumurta ve spermatozoayı bir araya getiren çalkalama hareketlerinde yakalanır. Yumurtanın döllemesi normal olarak uterus tüpünün ampullar kısmında (üstte üçte) meydana gelir. Tahminler spermatozoanın, kadın üreme kanalındaki işlevini yaklaşık 80 saat koruduğunu göstermektedir (Bruce ve Carlson, 2014).

4.7.3. Sperm Parametreleri

Rutin bir semen analizi, erkek fertilitésinin ilk araştırılmasında “altın standart” tır. Fiziksel özellikler (örneğin renk, hacim, pH, koku, viskozite ve sıvılaşma süresi), sperm konsantrasyonu, hareketlilik, ilerleme, canlılık ve morfoloji ve lökosit sayısı faktörler seminal boşalmada değerlendirilir. Sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji gibi sperm parametreleri erkek fertilitésinin belirteçleri olarak işlev görebilir ve kısırlığın testis nedenlerini yansıtabilir. Ancak, semen analizi, herhangi bir sonuca varılmadan önce iki veya üç ayrı durumda yapılmalıdır (WHO, 2010).

Tablo 1. Semen parametreleri referans değerleri

Parametre	En Düşük Referans Aralığı
Volüm (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Ph	≥7.2
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Total sperm sayısı (10 ⁶)	39 (33-46)
Total motilite (PR+NP,%)	40 (38-42)
Morfoloji (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Beyaz küreler	< 2x10 ⁶ /ml
MAR test (%)	< 50

4.7.3.1.Semen hacmi

Semen hacmi analizinde kullanılan metod semen örneği 15 ml hacmindeki konik tüpe koymak ve 0,1 ml seviyesine kadar olan yerlerde okumaktır. Hacim hesaplaması semen kabının boş ağırlığını ve ardından semeni koyup ağırlığını tespit ettikten sonra ikisinin farkının hesaplanması şeklinde de yapılabilir (Oehninger ve Kruger, 2009).

Seminal ve bulboüretal bezler, prostat ve epididimi yapısında var olan semen hacmi, sperm sayımında önemlidir. Semen hacmi için belirlenen oran 1,5 ml'dir (Kadioğlu ve ark., 2011). Normal değer aralığında kabul edilen semen hacmi 1.0 ile 6.5 ml arasındadır. Alt referans aralığının altındaki seviyelere seminal vezikül tıkanıklığı veya işlevsel anormallikler neden olmaktadır. Hacmin normalden az olması hipospermi, olmaması ise aspermi olarak tanımlanır. Semen volümü 1 ml'den az olduğunda semen örneğinin uygun şartlarda alınması kontrol edilir. Bu nokta semen örneğinin ilk kısmının en yüksek oranda sperm içermesi ve en yüksek motiliteye sahip olması dolayısı ile oldukça önemlidir (Oehninger ve Kruger, 2009). Volümün yüksek olması durumunda enfeksiyon varlığından şüphe edilir (Bay, 2015).

4.8.3.2.Sperm motilitesi

Sperm hücrelerinin hareketinin değerlendirilmesi yanı sıra spermilerin kalite yönünden incelemesi de yapılır (Kadioğlu ve ark., 2011). Spermin ileri hareketlilik derecesi gebelik oranlarıyla ilişkilidir. Spermilerin hareket kabiliyeti ısı vb. değişikliklerden olumsuz etkilenmemesi için diğer parametreler gibi en az yarım

saat, en fazla bir saat içinde incelenmelidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) kriterlerine göre motilitenin %40 ve üstünde olması gerekmektedir. Motilitenin normal sınırlar altında olmasına astenozoospermi denilir (Gökçe, 2011).

Motilite tayininde hareketsiz olan spermeleri elemek için hareketlilik derecelendirme sistemi kullanılabilir. Sperm motilitesi şu şekilde derecelendirilir (Kadıoğlu ve ark., 2011).

İleri hareket (Progresif Motilite): Düz bir şekilde veya büyük bir daire alanında sürekli hareket halinde olan spermi tanımlar

Yerinde hareket (Nonprogresif Motilite): Her hareketi yapıp ancak ilerleme kaydetmeyen sperm yapısını tarif eder. Ufak halkalar şeklinde yüzme, başını veya kuyruğunu çok zor hareket ettiren spermelere rastlanılabilir.

Hareketsizlik (Immotilite): Hareket kabiliyetinin yokluğu olarak tanımlanır.

Spermatozoanın motilitesi orta kısım ve kuyruk yapısının anatomik ve işlevsel açıdan düzgün çalışmasıyla ilgilidir. Orta kısımda yer alan mitokondilerce üretilen ATP hareketin enerjisini verir (Hassa, 2003). Artan viskozite, ilaçlar, sigara, alkol, skrotal ısı artışı vb. durumlar sperm hareketini azaltır veya yok eder (Kadıoğlu ve ark., 2011).

Ejakülasyondan 2 saat sonra spermatozoanın %50'sinin hareketlerini devam ettirmeleri beklenir. Bu değer %30'un altına düşmemelidir. Motilite değerlendirmesi özellikle düşük ısılardan etkilendiğinden, semen likefaksiyonu süresince örneğin 37°C'ye ayarlı inkübatörde bekletilmesi, mikroskopik incelemeninde tercihen ısı ayarlı objektifi bulunan mikroskopta yapılması uygundur. Spermatozoa immotilitesi denilince gerçek ölü spermilerden ayırt edilmesi gerekir. Zira hareketsiz her spermin ölü olması gerekmez (Hassa, 2003).

Gerçek sperm immotilitesi nedenleri enfeksiyonlar, sperm kuyruğunun aksonemi ve dynein kollarındaki defektler, antisperm antikolar, seminal lökositler ve "hostile seminal plasma" tarafından aşırı süperoksit yapımı, immotil silia sendromu (Kartagener sendromu), kısa kuyruk ya da kuyruk yokluğu defektleridir (Hassa, 2003).

4.7.3.3.Sperm morfolojisi

Morfolojik açıdan spermlerin incelenebilmesi için hazırlanan yaymaların tercih edilen boya ile boyanarak incelenmesi gerekir. Ardından morfoloji tayini için Kruger ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) kriterleri kullanılır. WHO 2010 standartlarına göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %30'dan az olmamalıdır. 1986'daki Kruger kriterlerine göre ise, morfolojik açıdan tüm spermler normal olmalıdır. Bu durum IVF başarısında önemli rol oynar. Yalnız 1990 da Menkveld ve arkadaşları tarafından bu kriter değiştirilmiştir. İnsan spermlerinin değişken morfolojisi değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır. Teknolojideki ilerlemelerle semedeki morfolojik açıdan normal spermler bilgisayar destekli sistemlerle belirlenebilir (Kadioğlu ve ark., 2011).

Sıkı kriterlere göre ölçülmüş olan sperm morfolojisi, fertil ve infertil erkekler arasında ayırım için en bilgilendirici semen ölçümü gibi görünmektedir (Guzick ve ark., 2001). Sıkı kriterlere göre sperm morfolojisinin incelenmesine başlarken temiz mikroskop camlarının hazırlanması, semen yaymalarının doğru hazırlanması, camların değerlendirilmesinin doğru yöntemlerle yapılması ile doğru optik ve büyütmelemlerin kullanılmasıyla başlar. Bundan başka, doğru sayıda spermatozoa değerlendirilmeli ve hepsinden daha önemlisi biyolojik kanıtlara göre normal spermatozoa morfolojileri kullanılarak değerlendirilmeler yapılmalıdır. Ayrıca bir ya da daha fazla ekstra semen hazırlanması orijinal semen analizi uygun olmadığında kullanılabilmesi açısından önemlidir (Oehninger ve Kruger, 2009).

Sperm preparatlarının boyanmasında en sık kullanılan özel boyalar sperm ve hücreleri kaliteli boyayan Papanicolaou boyası, buna benzeyen Shorr boyası ve hızlı sonuç vermesinden dolayı tercih edilen Diff Quick boyalarıdır. Bu boyalar sonucu sperm başı açık-koyu mavi boyanırken, boyun kısmı kırmızı ve kamçı kısmı maviden kırmızımsıya kadar bir renge bürünebilir (Gökçe, 2011).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) kriterlerinin morfoloji tayinine göre sınırda olarak değerlendirdiği spermleri, anormal morfolojik olarak değerlendiren ölçüte Kruger'in kesin ölçütleri denir (Hassa, 2003).

4.7.4.Semen Analizi ve Değerlendirilmesi

4.7.4.1.Yıkama ve yüzdürme (swim up) yöntemi

Swim up, sperm hazırlamada en sık kullanılan tekniklerden biridir. Swim up, bir hücre topağı veya sıvılaştırılmış bir semen numunesi kullanılarak gerçekleştirilebilir. Geleneksel swim up işleminde, yumuşak bir döndürmeyle elde edilen önceden yıkanmış bir sperm topağı konik bir tüp içine bir kaplama kültürü ortamına yerleştirilir. Bu teknikte kullanılan ortam spermi besleyici bir ortamla sağlar ve sperm hücrelerini çeker. Spermatozoa peletten ayrılır ve besiyerinde yüzer. Pelletten en uzaktaki sperm hücreleri, hareketli ve morfolojik olarak normal olma ihtimalinin en yüksek olduğu için geri kazanılır. Swim up yöntemi oligozoospermik erkekler için değiştirilmiştir (Makker ve ark., 2009) Bu modifiye metoda doğrudan swim up denir ve hücre topağından yüzmek yerine semenden yüzmeyi içerir. Doğrudan swim up, spermleri göç yoluyla ayırmanın en basit ve en hızlı yöntemidir. Yuvarlak tabanlı tüpler, semen ve ortam arasındaki yüzey alanını en üst düzeye çıkarmak için doğrudan yüzmek için kullanılır (Bjorndahl ve ark., 2010). Bu arayüz alanını daha da arttırmak ve alınan hareketli sperm sayısını artırmak için küçük hacimli çoklu tüpler kullanılabilir. Bu özel prosedürle, inkübasyonun 37.5 ° C'da inkübasyondan daha yüksek bir hareketliliğe yol açtığı bildirilen 34.5 ° C'de gerçekleştirilir. Swim up yöntemi basit ve nispeten ucuzdur (Beydola ve ark., 2013).

Ancak, bazı dezavantajlara sahiptir: Geleneksel swim up önce bir hücre topağı oluşturmak için gerçekleştirilen santrifüjlemenin ROS ürettiği gösterilmiştir. Alınan hareketli spermlerin miktarı nispeten düşüktür. Yüzmeye maruz kalan sperm hücrelerinin sadece yüzde 5-10'u geri alınır. Konsantre bir hücre peleti kullanıldığında, bazı hareketli spermler peletin ortasında tutulabilir ve böylece peletin kenarlarındaki sperm hücrelerine kadar hareket edemez (Beydola ve ark., 2013).

4.7.4.2.Yoğunluk (gradient) yöntemi

Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme, sperm hücrelerini yoğunluklarına göre ayırır. Böylece, santrifüjlemenin sonunda, her bir spermatozoon yoğunluğuyla eşleşen gradyan seviyesinde bulunur (Bjorndahl ve ark., 2010). Morfolojik olarak normal ve anormal spermlerin farklı yoğunlukları vardır. Olgun bir normal spermatozoon en az 1.10 g / mL yoğunluğa sahipken olgunlaşmamış ve morfolojik

olarak anormal bir spermatozoon 1.06 ile 1.09 g / mL arasında yoğunluğa sahiptir. Yüksek derecede hareketli, morfolojik olarak normal, canlı spermatozoa tüpün dibinde bir topak oluşturur. Santrifüj kuvveti ve süresi, lökositler ve yaşayabilir olmayan sperm hücreleri tarafından ROS üretimini en aza indirmek için mümkün olan en düşük değerlerde (<300 g) tutulmalıdır (Bourne ve ark., 2004). Ayrıca, canlı olmayan sperm hücreleri ve döküntüler canlı spermden ayrılmalıdır. Yoğunluk gradyanları sürekli veya süreksiz olabilir. Yoğunluk kademeli olarak sürekli bir degradenin tepesinden dibine kadar artar. Süreksiz degradelerin katmanları arasında açık sınırlar vardır. İkinci gradyan, birbirinin üzerine birkaç azalan yoğunluk katmanı yerleştirildiğinde oluşur. Yoğunluk gradyanlı sperm ayırma prosedürünün bileşenleri arasında HEPES'te temin edilen kovalent olarak bağlı hidrofilik silan ile stabilize edilmiş bir koloidal silika parçacıkları süspansiyonu bulunur. İki gradyan vardır: bir alt faz (% 90) ve bir üst faz (% 45). Son topağı yıkamak ve yeniden süspansiyon etmek için sperm yıkama ortamı (5.0 mg / mL insan albümini ile modifiye edilmiş HTF) kullanılır (Beydola ve ark., 2013).

4.7.5.Embriyo Secim Parametreleri

4.7.5.1.Embriyo morfolojisinin ışık mikroskobu ile statik değerlendirilmesi

Embriyo morfolojisinin görsel değerlendirmesi, embriyo seçiminde en geleneksel ve popüler yöntemdir.

Embriyoların kalitesi hakkında değerli bilgiler sağlayan çeşitli gelişim aşamalarında çeşitli parametreler değerlendirilebilir (Ebner ve ark., 2003). Embriyolar döllenen sonra 1. günde pronüklelerinin morfolojisini (Montag ve van der Ven, 2001), blastomerlerin sayısı ve şekline, 2. veya 3. günde parçalanma derecesine (Hardarson ve ark., 2001) ve blastosistin morfolojisine göre derecelendirilebilir. 5. veya 6. günde (Richter ve ark., 2001). Prosedüre bağlı olarak, embriyolar bir veya birkaç gelişim aşamasında değerlendirilir.

Morfolojik değerlendirme ucuz ve klinik ortamda uygulanması kolay olsa da, dezavantajları vardır. İlk olarak, embriyoların görsel olarak derecelendirilmesi öznel ve önemli bir uzmanlık gerektirir. Üstelik böyle bir uzmanlık mevcut olsa bile, teknik her zaman doğru değildir: düşük dereceli embriyolar genellikle yüksek gelişim potansiyeline sahip olduklarını ve terim için gelişebileceklerini kanıtlar.

Bu nedenle, embriyonun gelişimsel durumu hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlayan ve en önemlisi, niceliksel ve objektif olan alternatif bir embriyo değerlendirme metodu geliştirme yönünde bir itiraz olmuştur.

4.7.5.2.Preimplantasyon genetik tanı ve tarama

Kalıtsal genetik bozuklukları saptamak için preplantasyon genetik tanı geliştirilmiştir. Spesifik genetik mutasyonları teşhis etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı teknikleri yada flüoresans in situ hibridizasyonunu (FISH) kullanır. Bir preimplantasyon genetik teşhisi farklı aşamalarda embriyolara uygulanabilir: zigotlar (polar vücut biyopsisi), bölünme aşaması embriyoları (blastomer biyopsi) veya blastosistler (trofektoderm biyopsi) (Spits ve Sermon, 2009).

Alternatif bir yaklaşım, ileri yaştaki annelerde, tekrarlayan düşük veya implantasyon başarısızlığı veya şiddetli erkek faktörü kısırlığı vakalarında başvuranlarda IVF sonuçlarını iyileştirmek için geliştirilen preimplantasyon genetik taramadır. Bir bölünme aşaması embriyosunun bir blastomerinde sınırlı sayıda kromozomun FISH değerlendirmesini içeren klasik preimplantasyon genetik tarama formunun etkisiz olduğu ve karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) veya tek nükleotid bazlı teknolojiler ile yavaş yavaş değiştirildiği gösterilmiştir. Bu yaklaşımların her ikisi de bütün embriyonik genomun analiz edilmesini ve preimplantasyon genetik tanısı için farklı embriyonik aşamalarda kullanılmasını sağlar (Harper ve Harton, 2010; Harper ve Sengupta, 2011).

4.7.5.3.Taramada metabolik ve proteomik

Bir başka embriyo seçim yöntemi, embriyo metabolizmasının analizine dayanır. Kültür ortamındaki piruvat veya glikoz konsantrasyonundaki değişiklikler, embriyonun kalitesini belirlemeye yönelik bir araç olarak faydalı olmalarına rağmen embriyonun enerji metabolizmasını yansıtabilir. Öte yandan, oksijen tüketimi ve amino asit miktarı bir embriyonun yaşayabilirliğinin daha güvenilir göstergeleri olduğunu kanıtlamıştır (Lopes ve ark., 2007; Seli ve ark., 2008).

Son zamanlarda, tekli metabolitlerin analizi aşamalı olarak daha geniş bir yaklaşımla değiştirildi: bir embriyo metabolizmasının ve gen ekspresyon paternlerinin tam bir resmini sunan metabolomik veya protein sekretome profili. Her ne kadar birçok rapor embriyonun metabolik durumu ile uygulanabilirliği arasında

bir ilişki göstermiş olsa da, IVF klinikleri için potansiyel değerini belirlerken, şu anda bu tekniklerin klinik ortamda uygulanması zor olmaya devam etmektedir. Bunun nedeni, metabolomik veya salgılanmış protein analizlerinin, şu anda pahalı ekipman ve yüksek vasıflı personel gerektiren spektroskopik / spektrometrik ve kromatografik teknikleri içermesidir (.Nel-Themaat ve Nagy, 2011).

4.7.5.4.Hızlandırılmış görüntüleme ile embriyonik gelişimin dinamik değerlendirilmesi

Fare embriyolarında oluşturulan non-invaziv zaman atlamalı görüntülemeledeki son gelişmeler nedeniyle, artık embriyo bölünmelerinin ve diğer döllenme ile tetiklenen olayların dinamiklerini takip edebilir ve bunları embriyoların gelişim potansiyeli ile ilişkileri ortaya konulabilmektedir (Bischoff ve ark., 2008). Son yıllarda, bu tekniği çok farklı bir şekilde kullanan iki çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada, ilk iki embriyonik bölümün zamanlaması ve senkronizasyonunun insan embriyolarının gelişim potansiyelini etkilediğini göstermiştir (Wong ve ark., 2010). Yazarlar, birinci ve ikinci bölünme arasında uzun süreli veya atipik olarak kısa bir aralık olan veya iki hücreli blastomerlerin yüksek oranda eş zamansız bölünmeleri olan embriyoların blastosist aşamasına ulaşamadıklarını bildirdi. Bu, zamanında pronükleer oluşum ve ardından ilk ayrılmanın daha yüksek kalitede insan embriyoları ile korele olduğu önceki gözlemlerle uyumludur (Fenwick ve ark., 2002; Lemmen ve ark., 2008).

4.7.6.Bölünme evresi değerlendirilmesi

4.7.6.1.Embriyo bölünme hızı

Bölünme aşaması embriyoları, 2 hücreli aşamadan 8-16 hücreden oluşan sıkıştırılmış morula kadar değişir. Blastomer sayısı en yüksek prediktif değeri olan ana karakter olarak kullanılır. Kaliteli embriyolar uygun kinetik ve bölünme senkronizasyonu sergilemelidir.

Normal gelişen embriyolarda hücre bölünmesi her 18 ila 20 saatte bir gerçekleşir. Çok yavaş veya çok hızlı bölen embriyoların metabolik ve / veya kromozomal kusurları olabilir. Son zamanlardaki hızlandırılmış çalışmalar, sadece bölünmenin zamanlamasının değil, aynı zamanda her hücre bölünmesi arasındaki zamanın önemli olduğunu göstermektedir. Tüm blastomerler tam senkronize olarak bölündüğünde, yalnızca 2-, 4- veya 8 hücreli embriyolar gözlenir. Bununla birlikte,

asen kron gelişimin bir göstergesi olan 3-, 5-, 6-, 7- veya 9 hücreli embriyoların gözlemlenmesi siktir. Döllenme olayına göre puanlama zamanı, hücre bölünmesi kinetiğinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi için kesin olarak belirlenmelidir (Scott ve ark. 2007)

4.7.6.2.Blastomer büyüklüğü

2. günde embriyolarda blastomer boyutunda yüksek derecede düzenliliğın, yardımcı üreme tedavilerinin ardından artan gebelik sonuçları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Düzensiz bölünme, yani iki eşit olmayan büyüklükteki hücreye bölünen bir hücre, eşit olmayan bir sitoplazmik molekül dağılımına neden olabilir; proteinler ve mRNA'lar ve daha yüksek çoklu çekirdekleşme ve anöploidi insidansı ile korele olduğu gösterilmiştir. Embriyodaki nispi blastomer ebadı hem bölünme aşamasına hem de her bölünme bölümünün düzenine bağlıdır (Hardarson ve ark., 2001; Magli ve ark., 2001).

2-, 4- ve 8 hücreli embriyoların blastomerleri, evreye özgü olmayan embriyolar ve eşit evreye özgü embriyolar olmalıdır. Buna karşılık, 2, 4 ve 8'den başka hücre numaralarına sahip embriyoların blastomerleri, bir veya daha fazla blastomerin bölünmesinde asenkron olduğu için farklı boyutlara sahip olmalıdır. Bir 3 hücreli embriyo tercihen bir büyük ve iki küçük blastomere; 5 hücreli bir embriyo, üç büyük ve iki küçük küçük blastomer; 6 hücreli bir embriyo, iki büyük ve dört küçük blastomer ve bir 7 hücreli embriyo, bir büyük ve altı küçük blastomere sahip olmalıdır. Bununla birlikte, diğ erlerinden çok daha büyük bir veya iki blastomere sahip 4 hücreli bir embriyo; tüm blastomerlere sahip 3 hücreli bir embriyo; iki büyük ve üç küçük blastomere sahip bir 5 hücreli embriyo; veya bir küçük ve dört büyük blastomere 6 hücreli bir embriyo ve üç büyük ve dört küçük blastomere sahip 7 hücreli bir embriyonun tüm blastomerlerin boyutunda olsa normal blastomer boyutlarına sahip olduğu düşünülmez ve bu nedenle kabul edilmez (Fernando ve ark., 2012).

4.7.6.3.Transfer günü secimi

IVF de embriyolar genellikle 2-4 hücrelik aşamadan 2 gün sonra transfer edilmiştir. Bunun nedeni uterusun, uygun kültür sistemlerinin yokluğunda, embriyonun hayatta kalması için en güvenli ortam olmasıdır (Laverge ve ark., 2001). 3. günde uterusu embriyo transferi, doğal ortama daha yakın fizyolojik şartları sağlar

(Laverge ve ark., 2001). Embriyo transferinin geciktirilmesi en uygun embriyoların seçimine olanak verir. Laverge ve ark. (2001) embriyoların 3. güne kadar kültürde tutulduğu zaman embriyo kalite skorunun azalmasına rağmen, embriyo transferinin implantasyon ve gebelik oranları açısından 2. ve 3. gün embriyolar için karşılaştırılabilir olduğunu bulmuştur. Geniş bir retrospektif çalışma Schwarzler ve ark. (2004), toplam 1259 hastada blastokist evre transferleri ile ilgili olarak 2-3 günlük embriyo transferlerinin sonuçlarındaki farklılıkları değerlendirdi. Yazarlar, blastosist transferleri ile gebeliğin 2-3 günlük transferleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu bildirmişlerdir. Blastosist transferine karşı 2-3 günlük embriyoların transferinde elde edilen gebelik oranları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (Coşkun ve ark., 2000). Rienzi ve ark. (2002) daha sonra blastosist kültürünün, transfer günü 3. embriyolara karşı klinik sonuçları iyileştirmediğini doğrulamıştır. Günümüzde blastosist transferi ve neonatal / fetal doğum defektlerindeki rolü hakkında yeterli veri bulunmamakla birlikte, blastokistler üzerinde böyle bir rolü doğrulayabilecek preimplantasyon genetik tanı çalışmaları eksiktir (Schwarzler ve ark. 2004).

5.MATERYAL METOD

Bu çalışma Avrupa Şafak Hastanesi Tüp Bebek Merkezinde prospektif olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya kadın yaşının 18-35 arasında olduğu çiftler alınmıştır. Tüm hastalar infertilite açısından detaylı olarak değerlendirilmiştir ve kadın hastalara tubal patolojinin ekarte edilmesi amacıyla HSG çekilmiştir. Erkek hastaların hepsi semen analizi ile değerlendirilmiş olup sperm sayısı $>15 \times 10^6/\text{ml}$ ve $<15 \times 10^6/\text{ml}$ olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır ve hastalar çalışma kapsamına alınmıştır.

5.1. ICSI protokolleri ve yumurta toplama işlemi

Kullanılan cihaz, solüsyon ve malzemeler

Çalışmada, fertilizasyon sonrası dinamik embriyo kültürü ve takibi amaçlı olarak Unisense Fertilitatech tarafından üretilmiş olan kendi içerisinde optik bir gözlem ve kayıt sistemi olan ve iç haznesine yerleştirilen embriyoların %6 CO₂ ve %5 O₂ gaz karışımında ve 37°C’de dış ortamdan izole bir şekilde geliştirilmesine olanak veren Embryoscope ® marka time-lapse cihazı kullanılmıştır.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan solüsyonların bilgileri

Solüsyon adı	Katalog No:	Üretici Firma
Modifiye HTF medium	90126	Irvine Scientific
Sperm yıkama medium	9983	Irvine Scientific
PureSperm-100	ET-HIS05-QI/04	Nidacon
Single Step mediumu (SSMTM)	90161	Irvine Scientific
Serum Substitute Supplement (SSSTM)	99193	Irvine Scientific
Hyaluronidase Solüsyonu	90101	Irvine Scientific
% 10’luk PVP	90123	Irvine Scientific
Embriyo kültür yağı	9305	Irvine Scientific

Tablo 3. Kullanılan malzemelerin bilgileri

Malzeme adı	Katalog No	Üretici Firma
Konik tüp (15 ml)	Falcon 352095	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı (15 ml) tüp	Falcon 352001	BD Sciences
Yuvarlak tabanlı (5 ml) tüp	Falcon 352003	BD Sciences
25 cm ² 'lik flask	Falcon 353009	BD Sciences
60 cm kültür kabı	NUNC 150270	Thermo Scientific
60 cm kültür kabı	Falcon 353652	BD Sciences
Oosit toplama seti	Smiths ONS1833	Smiths Medical

5.2. ICSI tekniği ile inseminasyon uygulaması

Komplet medium hazırlığı

15 ml yuvarlak tabanlı Falcon tüp içerisine 9 ml Single Step Medium (SSM™) ve 1 ml Serum Substitute Supplement™ (SSS™) ilave edilmesi ile hazırlanır.

OPU kültür kabı hazırlığı

Her bir 60 cm'lik kültür kabında üç adet 300 ul'lik komplet medium damlacığı olacak şekilde, iki adet 60 cm'lik kültür kabı olarak hazırlandı ve damlacıkların üzeri embriyo kültür yağı ile kaplanır.

Hyaluronidase kültür kabı hazırlığı

Her bir 60 cm'lik kültür kabında dört adet 30 ul'lik komplet medium damlacığı olacak şekilde iki adet 60 cm'lik kültür kabı olarak hazırlandı ve damlacıkların üzeri embriyo kültür yağı ile kaplanır.

IVF kültür kabı hazırlığı

Her bir tüp içerisine 2 ml komplet medium olacak şekilde iki adet 5 ml'lik tüp olarak hazırlanır. Her bir kuyucuğunda 0,7 ml komplet medium olacak şekilde bir adet 4-kuyucuklu NUNC kültür kabı hazırlanır. Her bir kuyucuğun üzeri 0,3 ml embriyo kültür yağı ile kaplanır.

Embryoslide kültür kabı hazırlığı

Toplamda 12 adet kuyucuğu bulunan embryoslide kültür kabı içerisine %10 luk protein içeren 25 ul komplet kültür mediumu konulur ve sonrasında kuyucukların üzeri 1.2 ml kültür yağı ile kaplanır.

Standart kültür kabı hazırlığı

ICSI sonrası oositlerin fertilizasyon kontrol zamanına kadar büyümelerini sağlamak amacıyla hazırlanan kültür kabıdır. Bir gün önceden hazırlanan kültür kapları ve tüpler, içerdikleri kültür mediumlarının uygun gazlanmasını sağlayabilmek için kapakları yarı açık şekilde %5 O₂ , %6 CO₂ içeren ve 37°C ve %95 nem kontrolünde olan inkübatörlerde gece boyunca gazlanmaya bırakılır.

ICSI kültür kabının hazırlığı

Hazırlık sonrası en az 30 dk'lık bir süre ısınması için 37°C etüve kaldırılır.

ICSI kültür kabında Polyvinylpyrrolidone (PVP) damlacığı hazırlanması

%10'luk PVP damlacık hazırlığı, yoğun ve vizköz yapısından dolayı PVP, ICSI öncesi sperm hareketini yavaşlatarak daha sağlıklı morfolojik değerlendirme ve manipülasyon yapabilme amacıyla kullanılır.

Oosit toplama işlemi (OPU)

Oosit toplama işlemi steril koşullarda ve bu işlem için özenle seçilmiş bir ultrason ünitesi ve aspirasyon cihazı kullanılarak kısa süreli anestezi altında, ultrasonografi eşliğinde ve işlem için özel olarak tasarlanmış steril oosit toplama seti ve iğnesi kullanılarak gerçekleştirilir.

İğne yardımı ile her bir overden aspire edilen folikül sıvıları ve içerdikleri kümülüs-oosit kompleksleri (KOK), bir gün önceden hazırlanıp uygun şekilde gazlanmış modifiye HTF mediumu içeren 15 ml'lik yuvarlak tabanlı tüp içerisine toplanır ve laboratuara ulaştırılır. Tüp içerisinde laboratuara ulaştırılan bu KOK yapıları embriyolog tarafından önce steril pastör pipeti kullanılarak ve LAF kabin içerisinde konumlandırılan bir stereo mikroskop altında gerçekleştirilir. KOK yapıları sonrasında bir gün önceden hazırlanan ve gazlanarak pH değerinin 7,25-7,35 aralığında sabitlenen kültür mediumunda toplanılır.

ICSI için sperm örneğinin hazırlanması

Oositleri toplanan hastanın eşi işlem gününde üzerinde adı soyadı yazılı hasta protokolü ve barkodu olan steril sperm toplama kabı, hastaya da okutulur ve kimlik kontrolü yapıldıktan sonra gerekli hasta bilgilendirmesi yapılarak örnek alımı için özel olarak tasarlanmış odaya alınır. Sperm örneği mastürbasyon yöntemiyle steril sperm kabının içerisine toplanır ve sperm verme odasını laboratuvar kısmına bağlayan ara bölme yardımı ile laboratuvara ulaştırılır. İşlem günü hastanın eşinden yukarıda bahsedildiği şekilde elde edilen sperm örneği, aşağıdaki aşamalar takip edilerek ICSI için hazırlanır.

Yıkama solüsyonlarının hazırlanması

Likefaksiyon sonrası örnek Semen Buffer ile karıştırılarak homojenize edilir. Sperm Buffer +2-8 °C 'de buzdolabında tutulur ve işlemden bir gün evvel vaka başına yaklaşık 10ml olacak şekilde 25 cm² flaslara konulur ve 37 °C'ye ısınması için ağzı kapalı şekilde inkübatöre kaldırılır.

Sperm Buffer: 5mg/ml HSA içeren HEPES ile tamponlanmış kültür mediumu. Albümin spermatazooyu reaktif oksijen türevlerinden korurken, HEPES atmosferik ortamda pH' ı işlem için uygun değerde tutmaya yarar. AllGrad Wash (LifeGlobal) bu işlem için kullanılmaktadır.

Kalibrasyon: Santrifüjler kalibre edilmelidir. "g" değerini rpm' ya çevirmek için aşağıdaki denklem kullanılır.

$$g = 0,0000112 \times r \times N^2$$

$$g = \text{santrifuj kuvveti}$$

$$r = \text{tüpün dibinden santrifüjün rotoruna olan uzaklık (cm cinsinden)}$$

$$N = \text{dakikadaki dönme sayısı, (RPM, revolutions per minute)}$$

Sperm örneği, 30-40 dakikalık bir likefaksiyon süresi sonrasında iyice akışkanlık kazandığı gözlemlendiğinde makler kamerası ve mikroskop altında sperm sayma işlemi yapılır ve androloji kayıt defterine sperm sayısı, hareketliliği, morfoljik değerlendirmesi not edilir.

Yukarıda belirtildiği gibi daha önceden hazırlanmış olan gradient solüsyonları yardımı ile sperm yıkamada kullanılacak 2'li gradient tabakası hazırlanır.

Saf gradient (Pure Gradient)

%100'lük stok AllGrad (LifeGlobal) kullanılmaktadır.

Gradient'in Hazırlanması: Dilüsyon miktarları günlük olarak hasta sayısına ve yapılan işleme göre hesaplanmaktadır. Genellikle ejakülat örnekleri iki tüpe eşit bölünerek işleme alınır. Bu nedenle hasta başına en az 2ml'lik dilüsyonların yapılması gerekmektedir.

Üst Tabaka: %45 'lik tabaka, 4ml'lik %100'lük stok PureGradient ile 6ml Sperm Buffer (AllGrad Wash) karıştırılır.

Alt Tabaka: %90 'lık tabaka, 9ml'lik %100'lük stok PureGradient ile 1ml Sperm Buffer (AllGrad Wash) karıştırılır.

Yıkama için 15 ml'lik falcon konik tüp içerisine önce %90 lık olan mediumundan 1 ml tübün dibine konulur. Bu tabakanın üzerine, 1 ml %45 lik gradyen mediumu cam pastör pipet ve enjektör yardımıyla çok yavaş bir şekilde bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirilir.

- Ön incelemesi yapılmış olan sperm örneğinin 1 -1,5 ml'lik kısmı, hazırlanmış olan bu ikili gradiyent tabakası üzerine 45 dercelik açı ile steril pastör cam pipet ve pipetör vasıtasıyla konularak en üst kısımda yeni tabaka oluşturması sağlanır.
- Bu şekilde hazırlanan tüm örnekler, 1800 rpm de 20 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası yıkanarak ayrılan ve tübün tabanında toplanan sperm, steril cam pastör pipeti ile ve enjektör yardımıyla çekilir ve ardışık olarak 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanır. Yıkanmış sperm swim-up yöntemi ile falcon tüpleri içerisinde yüzdürülür. Gradient yöntemi ve swim-up ile ayrılan sperm üzerine bir gün önce hazırlanmış olan %10 SSS™ katılmış ve gazlanmış SSM mediumu eklenir.
- Hazırlanan sperm örneği, ICSI işleminde kullanılmak amacıyla 4-kuyucuklu kültür kabı içerisine eklenir ve 30-45 dakika 37° C de CO2 inkübatöründe tutulur.

- Yıkama sonunda elde edilen sperm hücreleri makler kamarası ve mikroskop yardımıyla değerlendirilerek androloji kayıt defterine kaydedilir.

5.3.ICSI öncesi hayluronidase enzim uygulaması

Uygulama yapılması planlanan zamandan en az 4 saat önce 15 ml'lik mavi kapaklı konik falcon tüp içerisine 9ml mHTF ve 1 ml SSS™ ileve edilerek 37°C etüv içerisine konulup ısınması beklenir.

Bu şekilde hazırlanıp uygun sıcaklığa ulaşan medium ile hem ayıklama işlemi hem de mikroenjeksiyon (ICSI) işlemi için kullanılacak kültür kapları hazırlanır. Ayıklama için kullanılacak kültür kapları içerisine öncelikle enzim uygulamasında kullanılmak üzere 375 ul mHTF + 125 ul Hyaluronidase solüsyonu karıştırılarak enzim damlacığı hazırlanır. Bu damlacığın yanına/etrafına mHTF mediumu kullanılarak 20 ul'lik 6-7 adet küçük damlacıklar (enzim uygulaması sonrası elde edilen oositlerin yıkanması ve enzimin uzaklaştırılması amacıyla) hazırlanır. Tüm damlacıklar hazırlandığında üzerleri embriyo kültür yağı ile kaplanır ve etüve konarak en az 30 dakika uygun sıcaklığa gelmesi ve dengelenmesi sağlanır.

5.4.ICSI uygulaması

ICSI işlemi öncesinde mikromaniplatöre oositi sabit tutma işinde kullanılan holding (Humagen Mph-SM-30) ve ICSI (Sunlight Medical SIC-50H-30) iğneleri takılarak işlem öncesi hazırlık yapılır.

Inseminasyon öncesi uygun şekilde hazırlanmış olan sperm örneği, hazırlanmış olan ICSI kültür kabı içerisinde yer alan PVP damlacığı içerisine pastör pipeti yardımıyla konulur ve böylece ICSI sırasında oosit içerisine enjekte edilecek spermeler seçilmek üzere hazırlanır. Uygun şartlarda ve sürede spermelerin seçilmesini ve immobilizasyon sonrası hazırlıklarını müteakip, oositler spermin bulunduğu kap içerisine hazırlanmış olan droplara konulur ve embriyolog tarafından her bir oosite 1 sperm enjekte edilecek şekilde mikroenjeksiyon işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem bittikten sonra oositler vakit kaybetmeden 1 gün önceden hazırlanmış ve dengelenmiş olan standart embriyo kültür kaplarına, stereo mikroskop, pastör pipeti ve ağız pipeti yardımıyla her bir damlacık (drop) içerisinde 1 oosit olacak şekilde ve aktarılır. Bu şekilde aktarımı yapılan kültür kabı inkübatör ortamına kaldırılır.

5.5.Fertilizasyon kontrolü ve ileri embriyo kültürü

İnseminasyon işlemlerinin yapıldığı günden bir gün sonra sabah saatlerinde (İnseminasyon sonrası 16-20. Saatler) ICSI ile inseminasyon yapılan oositlerde inverted 33 mikroskop kullanılarak fertilizasyon kontrolü gerçekleştirilir. Normal fertilizasyon gözlenen (döllenen) oositler yeni medium'a aktarılmak üzere ayrılır. Bu kontroller yapıldıktan sonra her iki gruba ait döllenmiş oositler (zigotlar) öncelikle kültür kabının her bir kuyucuğuna ICSI ile dölenmiş olan oositler embriyoslide içerisine aktarılır ve embriyoslide time-lapse inkübatörü içerisine (EmbryoScope; Unisense Fertilitatech, Denmark) yerleştirildi. Bu aşamada cihaz üzerinde gerekli zamansal bilgiler ve veri girişleri gerçekleştirilerek inkübasyon süreci başlatılır. Her bir embriyonun dinamik kültürde büyütüldüğü süre boyunca gelişimleri 7 farklı fokal düzlemde ve 20 dakikalık aralıklar ile elektronik olarak kayıt altına alınır.

Embriyoların blastosist aşamasına kadar büyütülmesi planlanan olgularda embriyo gelişiminin 3.gününde kayıt duraklatılır, gelişmekte olan tüm embriyolar yeni embriyoslide kültür kabına aktarılır embriyoslide cihaza yüklenir ve kayıt ve skorlama süreci kadığı yerden devam ettirilir.

5.6. İstatiksel Analiz

Veriler, ortalamalar ve %95 güven aralıkları (CI) olarak belirtilmiştir. Ortalamaların karşılaştırılmasında t- testi kullanılmıştır. İstatistiki anlamlılık derecesi olarak $p < 0,05$ alınmıştır.

6.BULGULAR

Avrupa Şafak Hastanesi Tüp bebek Merkezi'nde tedavi gören uygun kriterlerdeki 288 çift araştırmaya dahil edilmiştir. Adı geçen çiftlerin bazı genel tanımlayıcı özellikleri Tablo 4'te gösterilmiştir. Çiftler sperm sayılarına göre 2 gruba ayrılmış (grup 1'de normospermik >15mil/mL, grup 2'de ise oligoasteno teratospermik<15mil/mL) ve buna göre değerlendirmeye alınmıştır.

Gruplarda kadın yaşı, erkek yaşı,infertilite süresi ve bazal hormon değerleri arasında fark bulunmamıştır.

Tablo 4'de verilen bazal parametre oranları baz alınarak FSH, LH ve E2 oranında bir farklılık görülmemiştir.

Erkek yaşı faktörlü çalışmalarda 50 yaş üzeri olan hastalarda DNA fragmantasyonu yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda >15mil/mL sperm oranına sahip olan grup1 hastalarında erkek yaş oranı 35,65±5,37 olduğu için yaş faktörüne dahil değildir.

Tablo 4. Hastaların demografik verileri

	>15 mil/ml N= 115 Grup 1	< 15 mil/ml N= 173 Grup 2	p*
Kadın yaşı (yıl)	32,26 ±4,90	31,31±4,84	0,109
Erkek yaşı (yıl)	35,65 ± 5,37	35,18±5,77	0,499
İnfertilite süresi (yıl)	8,76 ± 5,42	8,21 ± 4,71	0,059
Bazal FSH	7,70 ±4,69	7,23 ±4,13	0,082
Bazal LH	5,63 ± 4,15	5,29 ±2,90	0,131
Bazal E2	54,91 ± 52,54	65,23±21,98	0,123

*student's t test

Siklus öncesi bazal hormon değerlendirilmesi sonucuna göre her iki gruptaki hastalarda; kullanılan gonadotropin dozu, ovülasyon indüksiyon süresi ve HCG günü E2 değerleri açısından gruplar arasında farklılık görülmedi.

Tablo 5. Gruplara göre ovulasyon indüksiyon sonuçları

	Grup 1(>15 mil/ml)	Grup 2(<15 mil/ml)	p
Toplam gonadotropin (IU)	2411,56 ± 1312,23	2392,23 ± 1142,79	0,210
Ovulasyon indüksiyon süresi (gün)	8,77 ± 1,89	8,64 ± 1,74	0,209
HCG günü E2	1879,55 ± 1689,25	1915,12 ± 1633,06	0,780

Her iki grup için yapılan oosit değerlendirilmesine göre; toplam oosit sayısı açısından anlamlılık gözlenmemiştir. İmmatür oosit sayısı grup 2 deki hastalarda anlamlı olarak farklı bulundu. Ancak M2 oosit sayısı ve 2PN zigot sayısı benzer bulundu.

Bu durumda matür oosit sayısı açısından farklılık gözlenmemiştir. Embriyo gelişimim sonucu açısından matür oosit sayısı önemlidir.

Tablo 6. Gruplarda oosit değerlendirmesi

	Grup 1	Grup 2	p
Toplam oosit sayısı	8,97 ± 6,5	9,14 ± 6,60	0,728
M2 oosit	6,78 ± 3,97	6,75 ± 6,60	0,116
M1 oosit	1,30 ± 0,96	1,31 ± 0,68	0,948
GV oosit	1,91 ± 1,39	2,20 ± 1,71	0,033

İncelenen embriyo gelişimlerine göre; erken bölünme ve gelişen blastokist sayısı grup 1 deki hastalarda oransal olarak yüksektir, bu da istatistiksel olarak anlamlıdır. Sperm konsantrasyonunun yüksek olması durumunda erken bölünme ve blastokiste gidişte artış gözlemlenmektedir.

Erken bölünme oluşan embriyolarda, gebelikle sonuçlanan sikluslarda sonuç her zaman daha yüksek bulunmuştur. Blastokiste giden embriyo sayısı grup1 deki hastalarda daha yüksektir ve oransallık açısından anlamlı bir sonuç gözlenmiştir. İncelenen her iki grup hastalarının embriyolarında; fertilizasyon, bölünen embriyo sayısı ve toplam G1-G2 embriyo sayısı benzer bulunmaktadır.

Tablo 7. Gruplarda embriyo gelişimi

	Grup 1	Grup 2	p*
2PN zigot	5,13±3,56	5,29 ±3,87	0,129
Bölünen embriyo sayısı	4,93 ±3,49	5,12 ±3,53	0,331
Erken bölünme	2,19 ±1,36	1,80 ±0,89	0,048*
Toplam Gr1 embriyo	2,53 ±1,77	2,60 ±1,90	0,589
Toplam Gr 2 embriyo	2,27 ±1,27	2,35 ±1,34	0,343
Blast	2,88 ±1,72	0,69 ± 0,13	0,000*

Hastaların incelenen sperm parametrelerinde; grup1 deki hastaların sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi, sperm morfolojisi, hazırlama sonrası sperm konsantrasyonu, hazırlama sonrası sperm motilitesi sonuçları istatistiki olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmaktadır. Bu veriler doğrultusunda grup1 deki hastaların gebelik oranı yüksek bulunmuştur.

Tablo 8. Gruplarda sperm parametreleri

	Grup 1	Grup 2	p*
Sperm konsantrasyonu (mil/ml)	53,16 ± 6,24	13,56 ±9,23	0,004
Sperm motilitesi (%)	30,85 ±15,52	15,43 ± 11,07	0,000
Sperm morfolojisi (%)	4,59 ±2,25	1,33 ±1,02	0,000
Hazırlanmış sperm konsantrasyon (mil/ml)	20,47 ±20,78	10,51 ±9,95	0,000
Hazırlanmış sperm motilite (%)	69,24 ±22,41	45,23 ±22,37	0,000
Gebelik (sak pozitif)	%45	%27	0,003

Her iki grupta da 3.gün grade 1 embriyo gelişim oranı ve 5.gün blastosist gelişim oranı benzer olarak tespit edilmiştir.

7.TARTIŞMA

Çiftlerin yaklaşık %15'i korunmasız bir cinsel hayata rağmen ilk bir yıl içerisinde çocuk sahibi olamamaktadırlar. Olguların %20'sinde erkek infertilitesi varlığı neden olmakta, %30-40'ında ise kadın infertilitesinin önemli olduğu belirtilmiştir. Bu durum infertilite olgularının yarısında erkek infertilitesinin neden olduğunu göstermektedir (Tournaye ve Cohlen, 2012). Bundan dolayı erkek infertilitesi değerlendirilirken semen analizi kullanılan en temel analizlerdendir. Bu analiz tüm infertil erkek değerlendirilmesinde kullanılır. İnfertil erkekler sperm sayısına göre WHO 2010 kriterlerine göre, sperm sayısı >15 milyon/ml olanlar, NZS (Normozoozpermi); sperm sayısı 5-15 milyon/ml arasında olanlar, hafif OZS (Oligozoospermi); sperm sayısı <5 milyon/ml arasında olanlar, şiddetli OZS (Oligozoospermi); ejakülatta sperm olmayan hastalar ise AZO (Azoospermi) olarak sınıflandırmaktadır (Tournaye ve Cohlen, 2012). Genellikle infertil erkeklerde %10-15 oranında azospermi görülürken, genel erkek popülasyonunun %1'inde azospermi izlenir (Jarvi ve ark., 2010).

1976'da ilk canlı tüp bebek doğumunu takiben yıllar içinde yardımcı üreme tedavi (YÜT) yöntemlerinde oldukça köklü değişiklikler olmuştur (ART, 2000). ICSI'nin gelişimi yardımcı üreme teknikleri alanında yeni bir çağ yaratmış ve erkek infertilitesinde yardımcı üreme tekniği protokollerinde önemli değişiklikler oluşturmuş ve şiddetli erkek infertilitesinin tedavisinde önemli bir ilerleme sağlamıştır. Genel olarak geleneksel IVF tedavisi ile karşılaştırıldığında ICSI tedavisi erkek infertilitesinde oosit başına daha yüksek fertilizasyon oranlarına ulaşmıştır. Bu yöntem ejakulatta şiddetli oligoastenoteratozospemisi olan hastalarda başlangıç tedavisi olarak sunulmaktadır. Oligoastenospermi gibi şiddetli vakalar bile ICSI ile başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir (Van der Wersterlaken ve ark., 2000). Azospermik erkeğin testisinden elde edilen spermatozoa kullanılarak 1993 yılında ilk başarılı gebelik gerçekleştirilmiştir (Schoysman, 1993).

Erkek faktörleri ya da anormal semen parametrelerinin bulunduğu durumlarda ICSI artarak kullanılmaktadır. ICSI sonuçları ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır fakat ICSI sonuçlarının analizinde erkek infertilitesinin rolü daha az belirgindir. ICSI evli çiftlerde, sadece erkek faktöründe değil aynı zamanda kadın faktöründe ve ikisinin beraber olduğu durumlarda da olası canlı doğumlarda artmaya

neden olmuştur. Tek başına erkek faktörünün ICSI başarısı çok açık değildir. Sperm kaynağı ve infertilitenin tipi nadiren incelenmiş, potansiyel önemli sonuçlara ulaşamamıştır (Nelson ve Lawlor, 2011).

Sperm morfoloji ve motilitesinin ICSI sonrası fertilizasyon oranlarına etkisi rapor edilmiştir. Ancak sadece birkaç çalışmada sperm konsantrasyonu ve motilitesinin ICSI sonuçlarına etkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda sperm kaynağının ICSI başarı oranlarına etkisi hakkında tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda erkek infertilite faktörlerinin embriyo gelişimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla çalışmaya dahil edilen çiftler sperm sayılarına göre 2 gruba ayrılmış (grup 1'de >15mil/mL, grup 2'de ise <15mil/mL) ve buna göre değerlendirilmeye alınmıştır.

Gebelik oranları kadın yaşının artması sonucunda azalmaktadır. Menopoz başlangıcında birkaç yıl önce düzenli ovulatuvar siklusları olmasına rağmen kadın fertilitesinde azalma yaşanır. Literatür çalışmaları fertilitenin kadınlarda yaş artması sonucunda azaldığı bildirilmiştir. IVF sikluslarında yaşın ilerlemiş olması olumsuz sonuçlara neden olmaktadır (CGP, 2008).Çalışmamızda her iki grupta da kadın yaşı ortalaması 35 yaş altında olduğundan verilerimize yaş faktörü dahil olmamaktadır.

Yaptığımız çalışmada hastalar ile gerçekleştirilen inseminasyon/mikroenjeksiyon öncesi grup1 ve grup 2 hastaları arasında ki kadın yaşı oranının ortalama 33 olduğu saptanmıştır. Bu oran istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmamıştır. Erkek faktörlü infertil olgularda klinik verilere göre kadın yaş faktörünün istatistiksel olarak bir etkisi bulunmamaktadır. Ayrıca bazal parametre oranları baz alınarak FSH, LH ve E2 oranında bir farklılık görülmemiştir. Buna ek olarak erkek yaşı faktörlü çalışmalarda 50 yaş üzeri olan hastalarda DNA fragmantasyonu yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda >15mil/mL sperm oranına sahip olan grup1 hastalarında erkek yaş oranı $37,73 \pm 12,43$ olduğu için yaş faktörüne dahil olmadığı görülmüştür.

Martin ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada gonadotropin stimülasyon süresinin ve dozunun gebelik sonuçları üzerinde bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. 699 adet siklusla yapılan bir değerlendirmede ise gonadotropin stimülasyon süresinin

uzamasının, canlı doğum seviyelerinde azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir (Chuang ve ark., 2010). Çalışmamızda ise siklus öncesi bazal hormon değerlendirilmesinde gonadotropin dozu, ovülasyon indüksiyon süresi ve HCG günü E2 değerleri açısından gruplar arasında farklılık görülmemiştir.

Genel olarak, oosit içine enjekte edilecek spermatozoanın seçimi brüt morfoloji ve hareketliliklerine dayanır. Düşük kalitede meni durumlarında, yanlışlıkla DNA hasarlı spermatozoa kullanma riski büyük olasılıkla daha yüksektir. Düşük kalitede spermin, DNA fragmentasyonu ile birlikte spermatozoanın daha yüksek oranda içerdiği bildirilmiştir. Spermatozoanın DNA hasarının yanı sıra sperm konsantrasyonu ve motilitesinin, geleneksel IVF sikluslarında döllenme ve gebelik ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Henkel ve ark. 2003).

Bununla birlikte, ICSI döngülerinde, DNA parçalanma indeksi ile sonuç arasındaki ilişki konusunda bir fikir birliği yoktur. Hashimoto ve ark(2010)'nın çalışmasında MII'de iki pronüklei (PN) oosit enjekte edilmiş ve 2. günde yüksek kaliteli embriyoların gelişimi, ayrıca 5. günde blastosist formasyon hızı, implantasyon oranı, klinik gebelikler ve fetal kayıp incelenmiştir. Sperm konsantrasyonunda, sadece 2PN oosit embriyolarının yüzdesi için anlamlı bir ilişki gözlemlenmediği, ancak hafif oligozoospermi ve ICSI'de çok şiddetli oligozoospermi vakaları arasında klinik sonuç için anlamlı bir fark gözlemlendiği bildirilmiştir. Ek olarak, zigot üretiminde veya spermatozoa ile <% 40 hareket kabiliyetine sahip spermatozoa ve ≥% 40 hareket ile spermatozoa arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirildi.

Ayrıca, yapılan çalışmalar sperm morfolojisinin ICSI sonuçlarında da önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Chemes ve ark., 2003). Bununla birlikte, bu çalışmalar, fertilizasyonun oluşumunu başarılı bir şekilde tahmin edebilecek bir veya daha fazla sperm parametresi için eşik değerlerini belirleyemedi ve böylece bireysel hastalar için en uygun tedaviyi belirlemek için kullanıldı. Optimal cinsel yoksunluk dönemi, taze ve donmuş sperm arasındaki farklılıklar ve kriptoosperminin nasıl tedavi edileceği de dikkate alınmalıdır. Çok ağır oligozoospermili hastalardan spermatozoa kullanarak ICSI yaparken gözlediğimiz gibi, morfolojik spermatozoa seçimi klinik gebelik oranını artırabilir. Çok şiddetli oligozoospermili hastalar, 2PN oositin anlamlı olarak daha düşük bir yüzdesini gösterir. Bu, özellikle çok ağır

oligozoospermili hastalarda oosit enjeksiyonu için kaliteli sperm seçilmesinin önemini vurgulamaktadır. Erekin (2015) 'nin yaptığı çalışmada da farklı olarak çok şiddetli oligospermi (0 to $<1 \times 10^6$ /ml) grubunda 2PN sayısı anlamlı düşük bulunmuş ancak klinik gebelik oranları açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir . Çalışmamızda ise her iki grup için yapılan oosit değerlendirilmesinde toplam oosit sayısı açısından anlamlılık gözlenmemiştir. Toplam immatür oosit sayısı grup 2 deki hastalarda anlamlı olarak farklı bulundu. Ancak M2 oosit sayısı ve 2PN zigot sayısı benzer bulundu. Embriyo gelişiminin sadece M2 oositler ile sağlanması nedeni ile immatür oosit sayısının sonuçları etkileme açısından bir değeri bulunmamaktadır.

Bir çalışmada erkek infertilitesi nedeniyle intrasitoplasmik sperm enjeksiyonu uygulanan hastalarda, ejakülat ve testis kaynaklı spermin tedavi üzerme olan etkileri incelenmiştir. 141 çiftin dahil edildiği bu çalışmada hastalar iki gruba ayrılmıştır (Seçkin ve ark 2012). Fertilizasyon ve klinik gebelik oranları gruplar arasında incelenmiş ve fertilizasyon oranı en yüksek oranda ejakülatuar sperm grubunda saptanmıştır. Fakat istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Bunun yanı sıra klinik gebelik seviyelerine bakıldığında ise gruplar arasında istatistiksel anlamda değişiklik gözlemlenmemiştir (Seçkin ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada semen parametrelerine göre hastalar gruplara ayrılarak incelenmiş ve semen kalitesi azaldıkça fertilizasyon oranlarının azaldığı fakat klinik gebelik oranlarında fark saptanmadığı belirtilmiştir (Loutradi ve ark., 2006).

Nagy ve ark. (2005) 966 mikro enjeksiyon siklusunu fertilizasyon, embriyo gelişimi ve gebelik oranları açısından analiz etmek için toplam sperm sayısı, sperm hareketliliği ve morfoloji faktörlerini inceleyerek, ICSI sonuçlarını ortaya koymuşlardır. Sperm bozukluğunun derecesinin ve şeklinin ICSI sonuçlarında çok fazla etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Sadece bir hareketsiz sperm oosit içine enjekte edilirse ICSI sonucuna önemli ölçüde etki edeceği belirtilmiştir. Bundan dolayı mikro-enjeksiyonda oosit başına en az bir canlı spermin olması ICSI için başarılı bir sonuç oluşturacağı anlamına gelmektedir.

Çalışmamızda ise hastaların incelenen sperm parametrelerinde; grup1 deki hastaların sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi, sperm morfolojisi, hazırlama sonrası sperm konsantrasyonu, hazırlama sonrası sperm motilitesi sonuçları istatistiki olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuş olup, grup 1 hastalarında gebelik oranı

daha yüksek olarak bulunmuştur. Her iki grupta da 3.gün grade 1 embriyo gelişim oranı ve 5.gün blastosist gelişim oranı benzer olarak saptanmıştır. Ayrıca erken bölünme ve gelişen blastokist sayısı grup 1 deki hastalarda oransal olarak daha yüksek çıkmıştır. Sperm konsantrasyonunun yüksek olması durumunda erken bölünme ve blastokiste gidişte artış gözlemlenmiştir. Erken bölünme oluşan embriyolarda, gebelikle sonuçlanan sikluslarda sonuç her zaman daha yüksek bulunmuştur. Blastokiste giden embriyo sayısı grup1 deki hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda fertilizasyon, bölünen embriyo sayısı ve toplam G1-G2 embriyo sayısında her iki grupta da benzer olarak bulunmuştur.Çalışmamızda erken embriyo bölünmesinin ve blastokist sayısının grup 1 de anlamlı bir artış göstermesi klinik gebelik sonuçlarını da açıklamaktadır.



8. SONUÇLAR

Bu çalışmada IVF/ICSI uygulaması yapılan sperm konsantrasyonu açısından farklı olan, 15 mil/ml üzerinde 115 ve 15 mil/ml altında 173 toplam 288 olgu bazal parametreler ve embriyo gelişimi ve gebelikler açısından değerlendirildi.

- İki grupta kadın ve erkek yaşı açısından farklılık gözlenmedi ($p=0,109$, $p=0,499$). Ve ortalama değerlerin kadında 33 yaş altında olduğu görülmüştür.
- Siklus öncesi bazal hormon değerleri, kullanılan gonadotropin dozu, ovulasyon indüksiyon süresi ve HCG günü E2 değerleri açısından gruplar arasında farklılık görülmemiştir.
- Toplam oosit sayısı ve immatür oosit (GV) 2. Grupta anlamlı olarak farklı bulundu. Ancak M2 oosit sayısı ve 2PN zigot sayısı benzer bulunmuştur.
- Çalışmamızda embriyo gelişimi incelendi ve erken bölünme, gelişen Blastokist sayısı sperm konsantrasyonu 15 mil/ml altında bulunan olgularda düşük bulunmuştur.
- Bölünen embriyo sayısı, toplam Gr.1 ve Gr.2 embriyo sayısı benzer bulunmuştur.
- Sperm parametreleri ise, konsantrasyon, motilite ve normal morfoloji 2. Grupta anlamlı olarak düşük bulunmuştur.
- ICSI spermilerin morfolojik seçimi ile gerçekleştirilmektedir. Gruplar arasında gebelik açısından görülen anlamlı farklılık sperm kromatini ve DNA fragmantasyonu gibi değerlerin farklı olabileceğini anımsatmaktadır.

KAYNAKLAR

- Albertini, D. F., Combelles, C. M., Benecchi, E., & Carabatsos, M. J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction-Cambridge-*, 121(5), 647-653.
- Anwar, S., Anwar, A. (2016). Infertility: A review on causes, treatment and management. *of*, 5, 2.
- Araújo, V. R., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., Gastal, E. L. (2014). In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, 12(1), 78.
- Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M., and Tsafiriri, A. (2005). Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146(1), 77–84.
- Assisted reproductive technology in the United States. (2000). 1997 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril*, 74: 641–53.
- Baker, T.G. (1963). A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, Vol. 158, No. pp. 417-433
- Bay, F. (2015). Sigara Kullanan ve Sigara Kullanmayan Infertil Erkeklerde Sperm DNA Hasarı ve Apoptozis. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- Beydola, T., Sharma, R. K., Lee, W., Agarwal, A. (2013). Sperm preparation and selection techniques. *Male Infertility Practice. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers*, 244-51.

- Biçeroğlu, Ö., (2017). Erkek İnfertilitesinde Semen Adam (Fertilin) Catsper ve Sox5 Ekspresyonları ve Sperm Fonksiyonları ile İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Bischoff, M., Parfitt, DE., Zernicka-Goetz, M. (2008). Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. *Development*, 135:953-62.
- Björndahl, L., Mortimer, D., Barratt, C. L., Castilla, J. A., Menkveld, R., Kvist, U., Haugen, T. B. (2010). A practical guide to basic laboratory andrology. Cambridge University Press..
- Bourne, H., Edgar, DH., Baker, HWG. (2004). Sperm Preparation Techniques. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (Eds). Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. 2nd edn. USA: Informa Healthcare pp.79-91.
- Broekmans, F. J., de Ziegler, D., Howles, C. M., Gougeon, A., Trew, G., & Olivennes, F. (2010). The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertility and sterility*, 94(3), 1044-1051.
- Bruce, M. Carlson, MD. (2014). Transport of Gametes and Fertilization in Human Embryology and Developmental Biology (Fifth Edition).
- Candan, Ö. (2017). 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. İstanbul. 50s.
- Chemes, E.H., Rawe, Y.V. (2003) Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 9:405–428
- Choi, Y., Rajkovic, A. (2006). Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters. *J Biol Chem*, 281:35747-35756.

- Chuang, M., Zapantis, A., Taylor, M., Jindal, SK., Neal-Perry, GS., Lieman, HJ. (2010). Prolonged gonadotropin stimulation is associated with decreased ART success. *J Assist Reprod Genet*, 27(12):711-17
- Committee on Gynecologic Practice of American College. (2008). O., Gynecologists, and M. Practice Committee of American Society for Reproductive, Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertil Steril*, 90(5): 154-5.
- Coskun, S., Hollanders, J., Al-Hassan, S., Al-Sufyan, H., Al-Mayman, H., Jaroudi, K. (2000). Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Human Reproduction*, 15(9), 1947-1952.
- Diaz, F. J., Wigglesworth, K., and Eppig, J. J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J. Cell Sci.* 120(8), 1330–1340.
- Dohle, G. R. (2010). Male infertility in cancer patients: review of the literature. *International journal of urology*, 17(4), 327-331.
- Downs, S. M., and Chen, J. (2008). EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 75(1), 105–114.
- Dragovic, R. A., Ritter, L. J., Schulz, S. J., Amato, F., Thompson, J. G., Armstrong, D. T., and Gilchrist, R. B. (2007). Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signalling enables initiation of Mouse cumulus cell expansion. *Biol. Reprod.* 76(5), 848–857.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Tews, G. (2003). Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update*, 9:251-62.
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122(6), 829–838.
- Ertekin H. (2015). Hafif ve şiddetli erkek infertilitesi İle açıklanamayan infertilitenin ıvf Sonuçları açısından değerlendirilmesi. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.

- Fan, H. Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., Hedrick, S. M., and Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324(5929), 938–941.
- Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, AP., Herbert, M. (2002). Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod*, 17:407-12.
- Fernando, J., Prados, SD, Josephine, G. (2012). The cleavage stage embryo. *Human Reproduction*, 27, 50-71.
- Findlay, JK., Drummond, AE. (1999). Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends Endocrinol Metab* 10:183-188
- Forabosco, A., C. Sforza, A. De Pol, L. Vizzotto, L. Marzona & V.F. Ferrario (1991). Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec*, Vol. 231, No. 2, pp. 201-208.
- Ford, W.C. (2010). World Health Organization (WHO) Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5. Edition. Switzerland.
- Fortune, JE., Cushman, RA., Wahl, CM., Kito, S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, 163:53-60
- Fraser, DM., Cooper, MA. (2009). Myles text book for midwives, 15th ed. Churchill Livingstone Elsevier.
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Juengel, J. L., et al. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25(3), 279–283.
- Gartner, LP., Hiatt, JL.(2006). Color Textbook of Histology. 3rd ed, Saunders Elsevier, 490-500.
- Gilchrist, R. B., Lane, M., and Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update* 14(2), 159–177.

- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., and Armstrong, D. T. (2001). Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. *Dev. Biol.* 240(1), 289–298.
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., and Armstrong, D. T. (2004). Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 83, 431–446.
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Dragovic, R. A., Hickey, T. E., Ritvos, O., and Mottershead, D. G. (2006). Molecular basis of oocyte–paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J. Cell Sci.* 119(18), 3811–3821.
- Gosden, R. Spears, N. (1997). Programmed cell death in the reproductive system. *Br Med Bull*, 53, 3; 644–661.
- Gökçe A. (2011). Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Turk Urol Sem*, 2:1-7.
- Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., Xu, D. (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1388–1393.
- Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., Lundin, K. (2001). Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*, 16:313–318.
- Harper, JC., Harton, G.(2010). The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril*, 94:1173-7.
- Harper, JC., Sengupta, SB. (2011). Preimplantation genetic diagnosis: State of the ART 2011. *Hum Genet*, 131:175-86.
- Hashimoto, H., Ishikawa, T., Goto, S., Koikeguchi, S., Fujisawa, M., Shiotani, M. (2010). The effects of severity of oligozoospermia on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycle outcome. *Systems biology in reproductive medicine*, 56(1), 91-95.

- Hassa, H. (2003). İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları. 1. Baskı. Eskişehir, *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları*, 127-65.
- Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Schill, W. B. and Kruger, T. F. (2003) DNA fragmentation of the spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 7:477-484
- Hirshfield, A.N. (1991). Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol Reprod*, 44: 6; 1157-1162
- Hussein, T. S., Froiland, D. A., Amato, F., Thompson, J. G., and Gilchrist, R. B. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci.* 118(22), 5257-5268.
- Jarvi, K., Lo, K., Fischer, A., Grantmyre, J., Zini, A., Chow, V., & Mak, V. (2010). CUA Guideline: The workup of azoospermic males. *Canadian Urological Association Journal*, 4(3), 163.
- Kadıoğlu, A., Kendirci, M., Aktan, G., Yaman, Ö., Çayan, S. (2011). İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. WHO Laboratuar El Kitabı, Türk Üroloji Derneği. 978- 975-00112-4-5.
- Kaipia, A., Hsueh, A.J. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol*, 59,349-363
- Kaivo-oja, N., Jeffery, L. A., Ritvos, O., and Mottershead, D. G. (2006). Smad signalling in the ovary. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 21-34.
- Kakarla, N., Bradshaw, K. (2008).Evaluation and Management of the Infertile. Glom.
- Kamel, RM. (2010). Management of the infertile couple: an evidence based protocol. *Reprod Biol Endocrinol*, 8:21.
- Karabulut, S., Keskin, İ., Kutlu, P., Delikara, N., Atvar, Ö., & Öztürk, M. İ. (2018). Male infertility, azoospermia and cryptozoospermia incidence among three infertility clinics in Turkey. *Turkish journal of urology*, 44(2), 109.

- Laverge, H., De Sutter, P., Van der Elst, J., Dhont, M. (2001). A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Human Reproduction*, 16(3), 476-480.
- Lemmen, JG., Agerholm, I., Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*, 17:385-91.
- Li, R., Norman, R. J., Armstrong, D. T., and Gilchrist, R. B. (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63(3), 839–845.
- Lopes, AS., Madsen, SE., Ramsing, NB., Lovendahl, P., Greve, T., Callesen, H. (2007). Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum Reprod*, 22:558-66.
- Loutradi, K. E., Tarlatzis, B. C., Goulis, D. G., Zepiridis, L., Pagou, T., Chatziioannou, E., Bontis, I. (2006). The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 23(2), 69-74.
- Magli, MC., Gianaroli, L., Ferraretti, AP. (2001). Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol Cell Endocrinol*, 183:29–34.
- Makabe, S., Naguro, T., & Stallone, T. (2006). Oocyte–follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microscopy research and technique*, 69(6), 436-449.
- Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R. (2009). Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res*, 129(4):357-67.
- Martin, JR., Mahutte, NG., Arici, A., Sakkas, D. (2006). Impact of duration and dose of gonadotrophins on IVF outcomes. *Reprod Biomed Online*, 13(5):645-50.
- McNatty, K. P., Lawrence, S., Groome, N. P., Meerasahib, M. F., Hudson, N. L., Whiting, L., Heath, D. A., and Juengel, J. L. (2006). Meat and livestock association plenary lecture 2005. Oocyte signalling molecules and their effects on reproduction in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 18(4), 403–412.

- McNatty, K. P., Moore, L. G., Hudson, N. L., Quirke, L. D., Lawrence, S. B., et al. (2004). The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128(4), 379–386.
- Mehlmann, L. M., Jones, T. L., and Jaffe, L. A. (2002). Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 297(5585), 1343–1345.
- Menzies, F. M., Shepherd, M. C., Nibbs, R. J., & Nelson, S. M. (2010). The role of mast cells and their mediators in reproduction, pregnancy and labour. *Human Reproduction Update*, 17(3), 383-396.
- Montag, M., van der Ven, H. (2001). Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Reprod*, 16:2384-9.
- Moore, K.L., Persaud, TVN. (2009). Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalçık H (Editörler). 2. Baskı; İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Nagy, Z. P., Liu, J., Joris, H., Verheyen, G., Tournaye, H., Camus, M., ... & Van Steirteghem, A. C. (1995). Andrology: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Human Reproduction*, 10(5), 1123-1129.
- Nelson, SM., Lawlor, DA. (2011). Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: a prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Med*, 8: e1000386.
- Nel-Themaat, L., Nagy, ZP. (2011). A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta*, 32(3): S257-63.
- Ng, E. H. Y., Chan, C. C. W., Tang, O. S., & Ho, P. C. (2005). Antral follicle count and FSH concentration after clomiphene citrate challenge test in the prediction of ovarian response during IVF treatment. *Human Reproduction*, 20(6), 1647-1654.
- Ng, E. H. Y., Chan, C. C. W., Tang, O. S., Yeung, W. S. B., & Ho, P. C. (2004). Effect of pituitary downregulation on antral follicle count, ovarian volume and stromal blood flow measured by three-dimensional ultrasound with power Doppler prior to ovarian stimulation. *Human Reproduction*, 19(12).

- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., and Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 136(11), 1869–1878.
- Oehninger, SC., Kruger, TF. (2009). Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi. Çeviri Editörü: Doç. Dr. Mete Kilciler. İstanbul; Habitat Matbaası, 2009;1-240.
- Oktay, K., Briggs, D., & Gosden, R. G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(11), 3748-3751.
- Oktay, K., Newton, H., Mullan, J., & Gosden, R. G. (1998). Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(5), 1133-1138.
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., and Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303(5658), 682–684.
- Reizel, Y., Elbaz, J., and Dekel, N. (2010). Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. *Mol. Endocrinol.* 24(2), 402–411.
- Richter, KS., Harris, DC., Daneshmand, ST., Shapiro, BS. (2001). Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril*, 76:1157-67.
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Iacobelli, M., Ferrero, S., Minasi, M. G., Martinez, F., Greco, E. (2002). Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Human Reproduction*, 17(7), 1852-1855.
- Ross, M. H. and W. Pawlina (2011). Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Sasseville, M., Ritter, L. J., Nguyen, T. M., Liu, F., Mottershead, D. G., Russell, D. L., and Gilchrist, R. B. (2010). Growth differentiation factor 9 signalling

requires ERK1/2 activity in mouse granulosa and cumulus cells. *J. Cell Sci.* 123(18), 3166–3176.

Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Campbell, B. K., Driancourt, M. A., Dupont, J., Fortune, J. E., Monget, P. (2011). Regulation of *folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants*. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 444-467.

Schoysman, R., Vanderzwalmen, P., Nijs, M., Segalbertin, G., Vandecasseye, M. (1993). Successful Fertilization by Testicular Spermatozoa in an in-Vitro Fertilization Program. *Hum Reprod*, 8(8): 1339-40.

Schwärzler, P., Zech, H., Auer, M., Pfau, K., Göbel, G., Vanderzwalmen, P., & Zech, N. (2004). Pregnancy outcome after blastocyst transfer as compared to early cleavage stage embryo transfer. *Human Reproduction*, 19(9), 2097-2102.

Scott, L., Finn, A., O’Leary, T., McLellan, S., Hill, J. (2007). Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod*, 22:230–240.

Seçkin, B., Batioğlu, S., Bardakçı, Y., Türkçapar, F., Erdoğan, M., Özdemir, E. (2012). The Effect of Ejaculated and Testicular Sperm on ICSI Outcomes in Severe Male Infertility *Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst*, 22(2): 95-101.

Sela-Abramovich, S., Chorev, E., Galiani, D., and Dekel, N. (2005). Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology* 146(3), 1236–1244.

Seli, E., Botros, L., Sakkas, D., Burns, DH. (2008). Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 90:2183-9.

Sermondade, N., Faure, C., Fezeu, L., Shayeb, A. G., Bonde, J. P., Jensen, T. K., Chavarro, J. E. (2012). BMI in relation to sperm count: an updated systematic

review and collaborative meta-analysis. *Human reproduction update*, 19(3), 221-231.

- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., and Richards, J. S. (2006). Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 20(6), 1352–1365.
- Sigman, M., Zini, A. (2009). Semen analysis and sperm function assays: what do they mean?. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 27, No. 02, pp. 115-123). © Thieme Medical Publishers.
- Spits, C., Sermon, K. (2009). PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat Diagn*, 29:50-6.
- Su, Y. Q., Denegre, J. M., Wigglesworth, K., Pendola, F. L., O'Brien, M. J., and Eppig, J. J. (2003). Oocyte-dependent activation of mitogenactivated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte–cumulus cell complex. *Dev. Biol.* 263(1), 126–138.
- Su, Y. Q., Sugiura, K., Li, Q., Wigglesworth, K., Matzuk, M. M., and Eppig, J. J. (2010). Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus–oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signalling. *Mol. Endocrinol.* 24(6), 1230–1239.
- Su, Y. Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Affourtit, J. P., Pangas, S. A., Matzuk, M. M., and Eppig, J. J. (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135(1), 111–121.
- Su, Y. Q., Wigglesworth, K., Pendola, F. L., O'Brien, M. J., and Eppig, J. J. (2002). Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotrophin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* 143(6), 2221–2232.

- Sugiura, K., Pendola, F. L., and Eppig, J. J. (2005). Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev. Biol.* 279(1), 20–30.
- Sutton, M. L., Cetica, P. D., Beconi, M. T., Kind, K. L., Gilchrist, R. B., and Thompson, J. G. (2003). Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* 126(1), 27–34.
- Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., and Thompson, J. G. (2010). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139(4), 685–695.
- Tayebi, N., Ardakani, SMY. (2009). Incidence and prevalence of the sexual dysfunctions in infertile women. *European Journal of General Medicine*, 6(2):74-77.
- Taylor, A. (2003). Extent of the problem. *ABC of subfertility*, 327(7412):434-436.
- Tingen, C., Kim, A., Woodruff, T.K. (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod*, 15: 12; 795-803.
- Törnell, J., Billig, H., and Hillensjö, T. (1991). Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Hum. Reprod.* 6(3), 411–422.
- Tournaye, HJ., Cohlen, BJ. (2012). Management of male factor infertility. *Best Pract Res Clin Obs Gyn*, 769-75.
- Tsafiriri, A., Chun, S. Y., Zhang, R., Hsueh, A. J., and Conti, M. (1996). Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev. Biol.* 178(2), 393–402.
- Vaccari, S., Weeks, J. L., 2nd, Hsieh, M., Menniti, F. S., and Conti, M. (2009). Cyclic GMP signalling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 81(3), 595–604.
- Van der Wersterlaken, L., Naaktgeboren, N., Verburg, H., Dieben, S., Helmerhorst, FM. (2006). Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertil Steril*, 85: 395-400.

WHO Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen, 5th edition, 2010.

Wong, CC., Loewke, KE., Bossert, NL., Behr, B., De Jonge, CJ., Baer, TM., Reijo Pera, RA. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*, 28:1115-21.

Yoshino, O., McMahan, H. E., Sharma, S., and Shimasaki, S. (2006). A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(28), 10 678–10 683.



AVRUPA ŞAFAK HASTANESİ TÜP BEBEK MERKEZİ

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı : Erkek faktörlü infertil olgularda embriyo gelişiminin değerlendirilmesi.

Sizi “ Erkek faktörlü infertil olgularda embriyo gelişiminin değerlendirilmesi” başlıklı bir araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan bilgiler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Bu çalışmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahipsiniz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınızı cevapladıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Tülay İREZ

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu çalışmada erkek faktörlü hasta eşlerinin bazal parametreleri, siklus öncesi bazal hormon değerleri, kullanılan gonadotropin dozu ve buna bağlı ovülasyon indüksiyon süresi ve HCG günü E2 değerleri arasındaki ilişki ve ICSI sonrası oosit gelişimi ve embriyo gelişimi incelenmesinde sperm parametrelerinin gebeliğe etkisi araştırılacaktır.

Farklı sperm hazırlama yöntemleri kullanılarak 2 farklı sperm sayısı grubunda erkek faktörlü infertil olguların embriyo gelişiminin değerlendirilmesini incelemek amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemezseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, vermiş olduğunuz doku örneğinin analiziyle ilgili süreç rutin olarak devam edecek ve işlem sonucunuzu yine planlanan tarihte almış olabileceksiniz. Kısacası bu çalışmaya katılıp katılmamanız analiz sürecini pozitif ya da negatif herhangi bir şekilde etkilemeyecektir.

Bu çalışmaya katılımın maliyeti nedir?

Bu çalışmanın maliyeti Avrupa Şafak Hastanesi tarafından karşılanacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanılacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Kübra KÜTÜKOĞLU

GÖREVİ : Araştırmacı

TELEFON : 05304812041

Avrupa Şafak Hastanesi Tüp Bebek Merkez Laboratuvarı'nda Biyolog Kübra KÜTÜKOĞLU tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yurütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Tüm harcamaları Avrupa şafak Hastanesi karşılamaktadır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum. Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerden meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sorun ile karşılaştığımda; Bio. Kübra KÜTÜKOğLU’nu 05304812041 nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorla olmaksızın, gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Katılımcının/Vasisinin/Velisinin Adı Soyadı:

İmza/Tarih:

Onama Tanıklık Eden Kişinin Adı Soyadı

İmza/Tarih

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Tülay İREZ

İmza:

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ ETİK KURUL BAŞKANLIĞINA ;

Hastanemiz Avrupa Şafak Hastanesi tüp bebek laboratuvarı çalışanı biyolog Kübra Kütükoğlu'nun Klinik Embriyoloji yüksek lisans tezinde kullanılmak üzere tüp bebek verilerini kullanmasına izin verilmiştir.

Başhekim
Bülent ŞAHİN


AVRUPA ŞAFAK HASTANESİ
Kurum Medya Kodu: 1027148
Uzm. Bülent ŞAHİN
Tıp Fak. No: 30557
Taktiryon ve Enfeksiyon Hast. Uzm.
Başhekim

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

29.03.2019

Sayın Prof.Dr.Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda planladığı “**Erkek Faktörlü İnfertil Olgularda Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi**” isimli araştırmanızın kurulumuzun **29.03.2019** tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.



Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Can Polat EYİGÜN

T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Tarih: 29.03.2019 Toplantı Sayısı:27	Karar No: 2019/27-33
	Prof.Dr.Tülay İREZ'in planladığı "Erkek Faktörlü İnfertil Olgularda Embriyo Gelişiminin Değerlendirilmesi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.

ÜYELER

Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Can Polat EYİGÜN	Tıp Fakültesi	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D	Etik Kurul Başkanı	
Prof.Dr.Leman ŞENTURAN	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik Bölümü	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof.Dr.Fatma ÇELİK	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik Bölümü	Üye	
Doç.Dr.Şölen HİMMETOĞLU	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya A.D.	Raportör	
Doç.Dr.Burcu KARADUMAN	Diş Hekimliği Fakültesi	Periodontoloji A.D.	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep HOŞBAY	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi.Ayşe Dilşad YAKUT	Eğitim Fakültesi	Özel Eğitim	Üye	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kübra Kütükoğlu

Doğum Tarihi ve Yeri : İstanbul – 25.07.1991

Mail Adresi: kubra.balota@gmail.com

Unvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
	İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	2013

Yayınları (Varsa)

Ödülleri (Varsa)