

T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AZOOSPERMİ VE NORMOZOOSPERMİ İNFERTİL VAKALARIN
TAM ZAMANLI İZLEME SİSTEMİNDE (*TIME- LAPSE*) EMBRİYO
MORFOKİNETİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyolog Ceren OCAKOĞLU
KLİNİK EMBRİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL

2015

T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AZOOSPERMİ VE NORMOZOOSPERMİ İNFERTİL VAKALARIN
TAM ZAMANLI İZLEME SİSTEMİNDE (*TIME- LAPSE*) EMBRİYO
MORFOKİNETİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyolog Ceren OCAKOĞLU
KLİNİK EMBRİYOLOJİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL

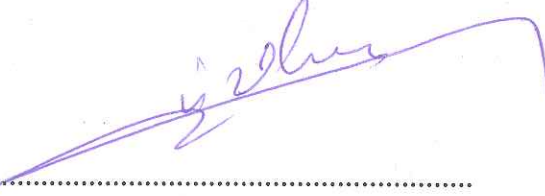
2015

T.C. Maltepe Üniversitesi
Sağlık Bilimler Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

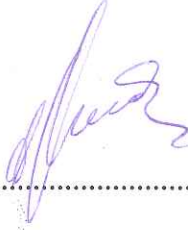
06.05.2015 tarihinde tezinin savunmasını yapan Ceren OCAKOĞLU'na ait
"Azoospermi ve Normozoospermi İnfertil Vakaların Tam Zamanlı İzleme
Sisteminde (Time-Lapse) Embriyo Morfokinetiğinin Karşılaştırılması" başlıklı çalışma,
Jürimiz Tarafından Sağlık Bilimler Enstitüsü Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek
Lisans Programında Yüksek Lisans Tezi Olarak Oy Birliği/Oy Çokluğuyla Kabul Edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet CINCIK
(Başkan)



Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ
(Üye) Danışman



Prof. Dr. Tülay İREZ
(Üye)

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi hazırlamam sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda özveri ve sabırla beni destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ'ye, her konuda ilgi ve desteğinden dolayı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet CINCIK'a ve tüm Maltepe Üniversitesi çalışanları'na,

Desteğinden dolayı Dr. Elif Güler ERGİN'e, tüm Eurofertil Tüp Bebek Merkezi çalışanlarına,

Her türlü bilgi ve birikimini benden esirgemeyerek paylaşan, her konuda yol gösteren Emb. Turgay BARUT'a, Emb. Ender YALÇINKAYA'ya, Emb. Özcan BUDAK'a,

Her zaman yanımda olan ve beni her koşulda destekleyen canım annem Yasemen ZAYİM'e, kardeşim Eren ve babam Ahmet OCAKOĞLU'na ve üzerimden desteğini hiç esirgemeyen teyzem Vahide ÖZDUMAN ve dayım Yamen ZAYİM'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

ÖZET

Ceren OCAKOĞLU, Azoospermi ve normozoospermi infertil vakaların tam zamanlı izleme sisteminde (Time-lapse) embriyo morfokinetiğinin karşılaştırılması, Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi, T.C. Maltepe Üniversitesi, İstanbul, 2015. İnfertilite, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre sonunda gebe kalınmaması şeklinde tanımlanır. Yardımla üreme teknikleri gebelik elde edilmesi için başvuru alan uygulamalarda kullanılan ICSI (İntrasitoplazik Sperm Enjeksiyonu) ciddi erkek faktörlü infertil olguların tedavilerinde yeni bir dönem yaratmıştır. Bunun ardından epididimden veya direkt olarak testisten sperm elde etme tekniklerinin gelişmesiyle azoospermi olgularda TESE sonucu elde edilen minimal sperm sayıları kullanılarak ICSI ile başarılı gebelikler elde edilebilmiştir. Nedeni açıklanamayan infertilite ise %1-37 gibi geniş bir dağılım içinde ortalama %10-15 olguda karşımıza çıkan bir sorundur. Yardımla üreme teknolojilerinin kullanılmaya başlandığı ilk yıllardan beri üzerinde birçok araştırma yapılmasına karşın, ilerlemenin oldukça sınırlı kaldığı konuların başında implantasyon potansiyeli yüksek embriyonun belirlenmesinde kullanılacak kriterlerin tanımlanması gelmektedir. Normal işleyişte, kontrol yapılan zamanların haricinde embriyoların gelişimleri hakkında fikir sahibi olunamamaktadır. Time-lapse içinde embriyoları görüntülemek amacıyla tasarlanmış dahili kameralar bulunmaktadır. Bu sayede döllenenmeden embriyo transferi aşamasına kadar yaklaşık 5 gün süren embriyo gelişimi takip süreci, hızlandırılmış bir video görüntüsü şeklinde izlenebilmektedir. Gerekli analizler yapıldığında, hangi embriyonun daha iyi gelişim gösterdiği ve en yüksek implantasyon oranına hangi embriyo veya embriyoların sahip olduğu ortaya çıkartılabilir.

Çalışmamızda sperm kaynağı farklı olan normozoospermiye sahip açıklanamayan infertil vakalar ve azoospermi vakaları arasında fertilizasyon oranları, embriyo morfokinetikleri, implantasyon oranları ve gebelik oranları karşılaştırılmıştır. Grup 1 ve grup 2'nin fertilizasyon oranları sırasıyla 75,05, 75,5 olarak bulunmuştur. Grup 1 ve grup 2'nin implantasyon oranları sırasıyla %37, %26 bulunmuştur. Grup 1 ve grup 2'nin gebelik oranları sırasıyla %53, %50 olarak bulunmuştur. Sperm kaynağı olarak farklı olan iki grup arasında fertilizasyon oranları, embriyo morfokinetiği ve gebelik oranları açısından bir fark olmamasına rağmen implantasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Sperm kaynağının etkisi implantasyon aşamasında görülmüştür.

ABSTRACT

Ceren OCAKOĞLU, Azoospermi and normozoospermi infertility cases in full -time monitoring system (Time-lapse) comparison of embryo morphokinetic. Clinical Embryology Master's Thesis, T.C. Maltepe University, İstanbul, 2015. Infertilité, unprotected sexual intercourse and regularly, but after a time a year is defined as pregnant or appearance cannot be reproduced. Reproductive techniques with assistance to obtain the labor used in referenced ICSI (intracitoplazmik sperm injection) severe male-factor infertile fact treatments has created a new term. This is then followed by testicular epididimal or direct with sperm development techniques to obtain azoospermi obtained as a result of cases TESE minimal sperm numbers using ICSI with successful pregnancy. Unexplained infertilité %1-37 such as if it is a wide range in average %10-15 case we face a huge problem. Reproductive technologies were started to be used with first since many years of research to be carried out on, but the progress has been very limited in early issues of embryo implantation high potential to be used in determining the definition of criteria have been met. Normally, the idea of the development of the embryos with the exception of the time control can not be made. In time-lapse embryos designed to display built-in cameras are available. Thus, fertilization embryo transfer, an approximately 5-day follow-up period of embryo development can be observed as an accelerated video image. When the necessary analysis performed, which showed better embryonic development and which can be demonstrated to have the highest implantation rate of the embryo or embryos.

In our study can not be explained with the different sperm source normozoospermi fertilization rates of infertility and azoospermia cases, the implantation of the embryo transfers between known cases morphokinetic embryos were compared implantation rates and pregnancy rates. Fertilization rate are %75,05 in the first group and %75,5 in the second group. Implantation rate are %37 in the first group and %26 in the second group. Pregnancy rate are %53 in the first group and %50 in the second group. Sperm as a source that is different between the two groups of fertilization, embryo morphokinetic and pregnancy rates although it is not a difference in implantation statistically meaningful difference was found. Effect of sperm source implantation phase has been observed.

Anahtar Kelimeler: Bölünme hızı, Ejakülat sperm, İmplantasyon, Testiküler sperm, Time-lapse. T.C. Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 11.03.2015 tarih ve 2015/900/36 numaralı karar ile onaylanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. ÜREME BİYOLOJİSİ.....	4
2.1.1. Gametogenez.....	4
2.1.1.1. Spermatogenez.....	4
2.1.1.1.1. Azoospermi ve mikro TESE.....	5
2.1.1.2. Oogenez.....	6
2.1.2. Fertilizasyon.....	7
2.1.3. Zigotun Yarıklanması.....	7
2.1.4. İmplantasyon.....	8
2.2. İNFERTİLİTE VE ÜREMEYE YARDIMCI TEDAVİ YÖNTEMLERİ.....	8
2.2.1. Time-lapse.....	9
2.3. İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (ICSI) VE SONRASINDA DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER.....	10
2.3.1. ICSI.....	10
2.3.2. ICSI Sonrası Embriyo Değerlendirme Parametreleri.....	10
2.3.2.1. Pronüklear Değerlendirme.....	11
2.3.2.2. Bölünme Evresi Değerlendirme.....	13
2.3.2.3. Blastosist Evresinde Embriyo Değerlendirme.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	16
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER.....	16

3.2. ÇALIŞMA GRUBU.....	16
3.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER.....	18
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	26
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR.....	38



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Azoospermi	: Ejakülatında sperm bulunmayan
cc2	: t3-t2, 2 blastomerden 3 blastomere geçiş süresi
cc3	: t5-t3, 3 blastomerli halden 5 blastomer olana kadar geçen süre
DNA	: Deoksi ribonukleik asit
EBSS	: Earl's Balanced Salt Solution
FSH	: Folikül stimülan hormon
Fragmantasyon	: Parçalanma
HSA	: İnsan Serum Albümin
ICSI	: İntrastoplazmik Sperm İnjesiyonu
IVF	: İn vitro Fertilizasyon(Tüp Bebek)
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
HCG	: İnsan koryonik gonadotropini
µl	: Mikrolitre
MESA	: Mikrocerrahi ile sperm aspirasyonu
MI	: Metafaz I evresindeki olgun olmayan oosit
MII	: Metafaz II evresindeki olgun oosit
Mikro TESE	: Mikro testiküler sperm ekstraksiyonu
Normozoospermi	: Normal sperm parametrelerine sahip
NOA	: Nonobstrüktif azoospermi
PVP	: Polivinilpirolidon
s2	: t4-t3, 3 blastomerden 4 blastomere geçiş süresi
SPSS	: Statistical Package for theSocial Sciences
Time-lapse	: Tam zamanlı izleme sistemi
TESA	: Testiküler sperm aspirasyon
t2	: Zigotun ilk iki blastomere bölündüğü zaman

t3 : 3 blastomer olduğu zaman
t4 : 4 blastomer olduğu zaman
t5 : 5 blastomer olduğu zaman
t6 : 6 blastomer olduğu zaman
t7 : 7 blastomer olduğu zaman
t8 : 8 blastomer olduğu zaman
ZP : Zona Pellicuda



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tesarik ve Greco pronükleus puanlama sistemi.....	12
Şekil 2. Embriyo gelişimi sırasında t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , $cc_2 = t_3 - t_2$, $s_2 = t_4 - t_3$ parametrelerinin grafikte gösterilmesi.....	17
Şekil 3. Time-lapse’de embriyo görüntüleri.....	26
Şekil 4. 2. gün transfer edilen grup 1 ve 2 embriyolarının morfokinetik parametrelerinin karşılaştırılması.....	28
Şekil 5. 3. gün transfer edilen grup 1 ve 2 embriyolarının morfokinetik parametrelerinin karşılaştırılması.....	29
Şekil 6. 3. ve 5. gün transfer edilen grup 1 ve 2 embriyolarının morfokinetik olarak karşılaştırılması.....	30
Şekil 7. Grup 1 ve Grup 2 transfer embriyolarının gebelik ve implantasyon oranları...32	

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Demografik özellikler ve grupların klinik karakteristikleri.....	27
Tablo 2. Ejakülat spermi ve testiküler sperm ile ICSI sonrası elde edilen 2. gün transfer embriyolarının time-lapse’de morfokinetik parametrelerinin incelenmesi.....	28
Tablo 3. Ejakülat spermi ve testiküler sperm ile ICSI sonrası elde edilen 3. gün transfer embriyolarının time-lapse’de morfokinetik parametrelerinin incelenmesi.....	29
Tablo 4. Ejakülat spermi ve testiküler sperm ile ICSI sonrası elde edilen 3. ve 5. gün transfer embriyolarının time-lapse’de morfokinetik parametrelerinin incelenmesi.....	30
Tablo 5. 2 grubun tüm transfer edilen embriyolarının Meseguer kriterleri ile karşılaştırılması.....	35
Tablo 6. Gruplar arasında gebelik ve implantasyon oranının karşılaştırılması.....	31

1. GİRİŞ

İnfertilite, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre sonunda gebe kalınmaması şeklinde tanımlanır. Yardımla üreme teknikleri gebelik elde edilmesi için başvurulan uygulamalardır. Bir in vitro fertilizasyon (IVF) siklusunda başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri transfer edilecek en iyi embriyonun seçimidir.

1984 yılında embriyoların morfolojik özellikleri ve bölünme hızları Edwards ve arkadaşları tarafından implantasyon potansiyelleriyle ilişkilendirilmiş ve ilerleyen yıllarda embriyoların kalitesini belirlemek üzere geliştirilen kümülatif sistemler bu özellikler dikkate alınarak oluşturulmuştur. Bu sistemlerin kullanılmasıyla azalan çoğul gebelik oranlarına implantasyon ve gebelik oranlarında gözlenen anlamlı artışlar eşlik edince araştırmacılar embriyo kalitesinin belirlenmesinde kullanılabilecek daha yeni ve kesin kriterler belirleme yoluna gitmişlerdir. IVF (İn vitro fertilizasyon) programlarında embriyo yaşayabilirliğini değerlendirmek için birçok yöntem ileri sürülmüştür. Bu yöntem herhangi bir aleti içeri sokmadan yapılmalı ve zaman alıcı olmamalıdır. Alışıla gelindiği gibi, transfer için seçilen embriyolar morfolojileri ve kültürdeki gelişim hızları temel alınarak seçilir. Embriyo kalitesinin belirlenmesinde kullanılabilecek bir diğer kriter de zamanlamadır. Embriyolar arasındaki farklılıkları en iyi belirleyecek kritik zaman noktasının seçimi çok önemlidir. Kültürdeki embriyo gelişimine ait gözlemler belli zamanlarda yapılır ve bu nedenle bölünme zamanı konusunda kesin bir bilgi elde edilemez (1). Aynı zamanda, embriyoları kültür edildikleri ortamdan çıkarmak ve onları ışığa maruz bırakmak kalitelerini olumsuz etkileyebilmektedir. Seçim yöntemleri, yaşayabilirlik oranı yüksek bir veya iki embriyoyu seçmemizi sağlayan bir program oluşturmak için kullanılmaktadır.

Bugün embriyoların seçiminde sadece seçim sırasındaki özellikleri değil, embriyoner gelişim pronükleer evreden itibaren izlenerek kaydedilmekte ve ardışık gözlemler belirli dönemlerde yapılarak, erken preembriyoner dönemde veya blastosist evresinde implantasyon potansiyeli yüksek olan tek bir embriyo Time-lapse (Tam zamanlı izleme sistemi) sayesinde seçilebilmektedir (2,3). İlk kez 1929'da Lewis ve Gregory tarafından time-lapse araştırmaları tavşan embriyolarında

yapılmıştır. Bu çalışma daha sonra genişletilmiş, hücre döngüsü uzunluğu, kompaktlaşma, blastosöl oluşumu ve çeşitli kültür koşullarının etkileri araştırılmıştır. İnsanlarda, ICSI (İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) sonrası oosit aktivasyonu, pronükleus oluşumu, bölünme time-lapse ile çalışılmıştır. Time-lapse sayesinde, ilk bölünme zamanı, multinükleasyonların oluşup kendi kendine tamir edilerek kaybolabileceği ve ilk kavitasyonun önemi daha iyi anlaşılmıştır (4).

Embriyo seçim kriterleri ne kadar önemli olsa da embriyoyu meydana getiren gametlerin özellikleri de bu gelişimde önemli rol oynamaktadır. Embriyonik genomun aktive olduğu 4-8 blastomerli döneme kadar embriyoner gelişim maternal genom ve oosit proteinlerince yürütülür. IVF uygulamalarında oosit morfolojisi kadar sperm özelliklerinin de etkisi incelenmektedir. Oositlerdeki özellikle intrasitoplazmik anomaliler embriyoner gelişimi etkilerken sağlıklı sperm seçimi için de çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Sitoplazma içine sperm enjeksiyonu (ICSI) tekniği ile seçilen tek bir sperm yumurta sitoplazması içine enjekte edilir. Böylece zona pellusida ve yumurta zarı devre dışı bırakılır. ICSI'nin sperm karakterlerinden bağımsız olarak yüksek fertilizasyon ve gebelik oranı sağlaması nedeni ile, erkek verimsizliğinde en güçlü mikro manipülasyon yöntemi haline gelmiştir. ICSI'nin tedavi edici olanakları sperm seçiminin zayıf ileri doğru kendiliğinden hareket gücü olan sperm vakalarından azospermi vakalarına, mikro cerrahi ile epididim ve testisten spermin elde edildiği vakalara kadar uzanmaktadır (5). Testiküler spermin dölleme yeteneği kazanabilmesi için 1 veya 2 hafta epididimis boyunca yol alması gerekir. Epididimal tübül boyunca aldığı yol sonunda sperm hareket yeteneği kazanır ve kapasite olur. Testiküler sperm daha az olgundur ve ejakülat spermine göre daha az fertilizasyon yeteneği vardır, çünkü sperm matürasyonunun son basamağı epididimiste gerçekleşir. ICSI ile, testis ve epididimden elde edilen spermlerin olgunlaşma basamaklarının devre dışı bırakılması ile akrozom reaksiyonun, zona pellisudaya bağlanabilme ve yumurta hücre zarı ile birleşmesinin atlanabilmesi ihtimalleri ile erkek faktörüne bağlı verimsizliğe rağmen fertilizasyonda başarıya ulaşılabilceği gösterilmiştir (6).

Sperm kalitesi, embriyogenez ve implantasyon potansiyelinde etki sahibi olabilmektedir. Çalışmamızda sperm kaynağı olarak farklı iki gruptan; normozoospermiye sahip açıklanamayan infertil vakalarda ve azospermi

vakalarında ICSI (İntrastoplazmik Sperm İnjeksiyonu) sonrasında implantasyonu bilinen transfer embriyolarının gelişimleri tam zamanlı izleme sisteminde (Time-lapse) izlenerek morfokinetik olarak karşılaştırılacaktır. İki grup arasında fertilizasyon oranları, implantasyon ve gebelik oranları da karşılaştırılacaktır.

Spermatik kusurların etkisini belirlemek zordur. Bu yüzden time-lapse ile iki grubun embriyolarının gelişimlerini pronükleusların oluşumu, erken klivaj, bölünme hızı, blastomer sayıları ve farklı zamanlarda karakteristiklerini inceleyerek implantasyon potansiyeli daha yüksek embriyolar transfer için seçilebilir.

Time-lapse, embriyoların gelişimini daha detaylı bir şekilde inceleyebilme imkanı tanımıştır. Bunun sonucunda en iyi kriterlere sahip embriyolar transfer edilirse anne ve bebek sağlığını tehdit eden çoğul gebelikleri önleyip, gebelik başarısının daha fazla olacağı düşünülmektedir. Embriyo seçim kriterleri sadece transfer edilecek embriyoların belirlenmesinde değil, aynı zamanda dondurulacak embriyoların seçiminde de kullanılması gereken değerlendirmelerdir ve tek embriyo transferinin maliyet ve başarısını etkileyen bir uygulama olan dondurma protokollerinin başarısında da önemli rol oynamaktadır (7).

Dünya çapında yardımla üreme tekniklerinde, çoğul gebeliklerin anne ve bebek sağlığını tehdit eden medikal sorunlara neden olması ve bunların telafisinin ülkelerin ekonomisine getirdiği yük dikkate alındığında, bunu önlemek için transfer edilen embriyo sayısının azaltılmasına hatta tek embriyo transferi yapılması yoluna gidilmiştir.

Hedefimiz, implantasyon olasılığı yüksek olan embriyoları belirleyebilme yeteneğimizi arttırarak, bazı çiftlerde tek embriyo transferi yönünde çalışmalarımıza devam etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ÜREME BİYOLOJİSİ

2.1.1. Gametogenez

Erkek ve kadın gametleri olan sperm ve ovum haploid kromozom taşıyan, özelleşmiş cinsiyet hücreleridir. Gametogenezis sırasında mayoz bölünme ile kromozom sayısı yarıya düşer. Bu olgunlaşma sürecine erkekte spermatogenez, kadında ise oogeneze denir (8).

2.1.1.1. Spermatogenez

Testisler 900 adet her biri 5 m uzunlukta seminifer tübülden oluşur, spermler burada meydana gelir. Sperm hücrelerini oluşturan kök hücreler, spermatogonia, her seminifer tübülün dış kenarında yer alır. Gelişmekte olan sperm hücreleri, mayoz ve farklılaşma geçirirlerken, tübülün ortasındaki boşluğa doğru hareket ederler. Ortalama 24 günlük bir süreç içinde sertoli hücre tabakasına ulaşan her bir spermatogonium büyük değişim evresine girer ve primer spermatosit oluşturmak üzere genişler. Mayoz sonucunda oluşan dört hücrenin hepsi olgun sperm hücrelerini oluştururlar. Spermilerin daha sonra geçiş yaptığı bölüm olan epididimis, toplam 6 m boyunda halka yapısında tübüldür. Epididimis vas deferans ile devam eder ve ampulla bunun bir parçasını oluşturur. Sonra gelen prostat bölgesinde seminal veziküllerde bir kanal ile salgılanırlar. Daha sonra duktus ejakulatorius ve uretra gelir. Seminifer tübül ve epididimis başlangıcındaki sperm immotildir. 18-24 saat epididimide kalırsa motilite özelliği kazanır ancak epididimal sıvıdaki inhibitör proteinler ejakulasyona kadar hareket oluşumunu inhibe eder. Seminifer tübüle giren spermde baş, boyun, gövde ve kuyruk bölümleri vardır. Baş bölümünde golgi aparatından oluşan ve hyaluronidaz içeren akrozom (hidrolitik ve proteolitik enzimleri içerir), haploid nükleus vardır (9, 10, 11).

2.1.1.1.1. Azoospermi ve Mikro TESE

Azoospermi, ejakülatta hiç sperm bulunmaması anlamına gelir ve erkeklerin %1'inde, infertilite yakınması olanların ise %10-15'inde bulunur (12). Ejakülatta hiç sperm hücresi olmaması çeşitli nedenlere bağlıdır. Bunlar; sperm kanallarında tıkanıklık, sperm kanallarının doğuştan olmaması, hormonal nedenler, genetik nedenler, erkekte sperm üretimi sağlayan genler Y kromozomu üzerindedir, bu genlerdeki problem sperm üretimini etkiler. Kanser tedavisi nedeniyle radyasyon alınması bazen sperm üretimini tamamen ortadan kaldırabilir. İlaçlar, özellikle kanser tedavisinde kullanılanlar ve enfeksiyon (kabakulak sonrası) ejakülatta sperm bulunmamasının nedenleridir (13,14). Non-obstrüktif azoospermi (NOA), testislerde tam olarak gelişmiş sperm minimal olması ya da üretilmemesi nedeniyle ejakülatta spermatozoa yokluğu olarak tanımlanır (15). NOA olgularında günümüzde kabul gören tedavi mikro testiküler sperm ekstraksiyonu (mTESE) yöntemi Schlegel tarafından tanımlanmıştır (16). Mikro TESE, ejakülatta hiç sperm hücresi bulunmayan hastaların, mikroskopik operasyon ile testislerinden alınan dokuların belli işlemlerden geçirilerek sperm aranmasıdır. TESE operasyonu, azoospermi tedavisinde başarı ile uygulanabilen bir yöntemdir (17).

TESE'de elde edilen spermatozoalarla intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) kullanılarak sağlıklı gebelikler sağlanabilmektedir. ICSI, 1992 yılında Palermo tarafından uygulanmış ve ilk gebelik gerçekleşmiştir (18). ICSI işleminde kullanılmak üzere mikro TESE operasyonları genelde yumurta toplanmadan önce yapılır. Eğer sperm bulunursa dondurulur ve ICSI işleminde kullanılır. Böylelikle kadın partnere boş yere işlem yapılmamış olur (19).

Sertoli hücrelerinden ayrılan spermatid ve spermatozoa oksidatif stres ve sertoli hücrelerden salınan nutrisyonel destekten yoksun kalmaya bağlı DNA hasarına maruz kalır. Buna bağlı spermatozoanın destek hücrelerden ayrılma süresi de uzar. Bu ana fikirden yola çıkarak, DNA hasarının testisten ayrıldıkça artacağını söyleyebiliriz. DNA hasarı yüksek olan erkekler için ejakulat sperm ile başarısız ICSI sonrasında testiküler sperm ile ICSI uygulanması düşünülebilir (20). Her ne kadar testiküler sperm, tekrarlayan ICSI başarısızlıklarında DNA hasarı açısından tercih edilse de; seminifer tübül epitelinde apoptozise bağlı ve spermiyogenezde

kromatinin remodelasyonu sırasında defektlere bağlı testiküler sperme ait DNA hasarı olabilmektedir (21).

Testiküler spermlerin, ejakülat spermleri ile kıyaslandığında fertilizasyon oranlarının düşük olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (22). Testiküler spermatozoa, epididimin pozitif etkilerinden yoksundur. Bu nedenle her ne kadar canlı olsalar da, fertilizasyon oranları MESA (Mikrocerrahi ile sperm aspirasyonu) ile elde edilen spermlerle yapılan ICSI kadar yüksek değildir (23). Bu nedenle ekstrakte edilen spermatozoaların ICSI anına kadar kültüre edilmesi en azından motiliteyi artırarak canlı spermatozoaların seçimine ve dolayısı ile ICSI'nin başarısını artırmaktadır (24).

TESE materyali %0.5 HSA (Human Serum Albumin) ile desteklenmiş EBSS(Earl's Balanced Salt Solution) mediumu içerisinde in-vitro şartlarda 30°C'da 24 saat boyunca inkübe edilir. Motiliteyi artırıcı ajan: rec-FSH veya pentoksifilin kullanılabilir (25).

2.1.1.2. Oogenez

Oogenez, olgun ve döllenmemiş yumurta hücrelerinin gelişimidir. Yumurtayı oluşturacak kök hücreler olan oogoniyumlar, gelişmekte olan dişi embriyoda çoğalır ve mayozu başlarlar; ancak bu süreç, profaz I evresinde durur. Birincil oositler olarak adlandırılan bu aşamadaki hücreler, hormonlar tarafından yeniden aktive edilecekleri ergenlik dönemine kadar, küçük foliküller içinde hareketsiz kalırlar. Ergenlikte başlayan FSH etkisi ile, belirli zamanlarda uyarılarak, folikülün büyümesi ve birincil oositin mayoz I evresini tamamlayarak, mayoz II'ye başlaması sağlanır. Mayoz tekrar durur, ovulasyon sırasında salınan ikincil oosit, mayoz II'ye hemen devam etmez. İnsanlarda, spermin yumurta hücresine girmesi, mayozun tamamlanmasını tetikler ve sonrasında oogenez gerektiği gibi sonuçlanır (8).

2.1.2. Fertilizasyon

Döllenmenin asıl işlevi, iki bireyden gelen haploid kromozom takımlarını tek bir diploid hücrede, yani zigotta, birleştirmektir. Diğer bir işlevi ise, yumurtanın aktivasyonudur. Spermin yumurtanın yüzeyi ile ilişki kurması, yumurtanın içerisinde embriyonik gelişimin başlamasını tetikleyen metabolik reaksiyonları başlatır.

Sperm, folikül hücre tabakasına doğru hareket eder ve yumurtanın zona pellucidasında reseptör moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma akrozomal reaksiyonu aktive eder, sperm zona pellucida içine hidrolitik enzimleri salar. Bu enzimlerin yardımı ile sperm yumurtanın plazma zarına ulaşır; spermin zar proteinleri, yumurta zarı üzerindeki reseptöre bağlanır. Yumurta zarlarının kaynaşması ile sperm hücresi içeriğinin yumurtaya girmesi mümkün hale gelir. Yumurtanın kortikal reaksiyonu boyunca zona pellucidayı sertleştiren enzimler salınır; zona pellucida polispermiye karşı engelleyici işlev görür (26).

2.1.3. Zigotun Yarıklanması (Klivaj)

Yarıklanma, zigotun bir dizi mitotik bölünmeden geçtiği süreci ifade eder. Buna bağlı olarak, hücre sayısında hızlı bir artış olur. Blastomer adı verilen bu hücreler her yarıklanma bölünmesiyle daha çok küçülür. Başlangıçta zigot iki blastomere ayrılır, daha sonra bölünerek dört, sekiz şeklinde artan blastomerler oluşur. Yarıklanma normalde, zigotun uterin tüplerden uterusu yolculuğu sırasında gerçekleşir. Zigot yarıklanma sırasında oldukça kalın ve jöle kıvamındaki zona pellucida içerisindedir. Zigotun blastomerlere bölünmesi fertilizasyondan ortalama 30 saat sonra başlar. Blastomer sayısı 12-16 olduğunda morula adını alır. Morula uterusu girdiğinde uterus boşluğundaki sıvı iç hücre kitlesinin hücreler arası boşluğunda toplanmaya başlar. Bu boşlukların genişleyip birleşmesiyle blastosöl denilen tek bir boşluk oluşur. Bu dönemdeki embriyo blastosist adını alır. Blastosistin bir kutbuna yerleşmiş iç hücre kitlesi embriyoblast, dış hücre kitlesi trofoblast adını alır. Blastosist, uterus salgısı içinde yaklaşık 2 gün kaldıktan sonra zona pellusidadan kurtulması, blastosistin hızla büyümesine ve implante olmasına olanak verir (27).

2.1.4. İmplantasyon

İmplantasyon, insanlarda normal olarak embriyonun blastosist aşamasında gerçekleşir. Fertilizasyondan yaklaşık 6 gün sonra, blastosist iç hücre kitlesine komşu trofoblastlar sekretuar fazdaki endometriyum epiteline tutunmaya başlar. Yaklaşık 8. gün blastosist endometriyum içine kısmen gömülür. Trofoblastlar içte tek nükleuslu sitotrofoblastlar ve dışta çok nükleuslu sinsityotrofoblastlar olmak üzere iki tabakaya ayrılır ve bu aşamada endometriyum içerisine tamamen yerleşir (1).

2.2. İNFERTİLİTE VE ÜREMeye YARDIMCI TEDAVİ YÖNTEMLERİ

İnfertilite, korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl süre sonunda gebe kalınmaması olarak tanımlanır. Bugün oositlerin in vitro fertilizasyonu (IVF) ve yarıklanan zigotun uterus içerisine transfer edilmesiyle infertil olan özellikle de tüplerdeki tıkanıklığa bağlı birçok kadın çocuk sahibi olmuştur. Tarihi gelişim içerisinde standart IVF ilk olarak kadında bilateral tubal blok olması nedeniyle infertilite problemi olan çiftlere uygulanmıştır (7).

Standart IVF için kullanılacak sperm laboratuvarında işleminden geçirildikten sonra en hareketlileri seçildiği ve oosit başına kullanılacak sperm sayısı az olduğu için erkek subfertilitesinde de kullanımına başlanmıştır (70).

Sperm disfonksiyonunun spermin zona pellucida (ZP)'ya bağlanma ve penetrasyon bozukluğu olduğu durumlar karşısında bilim adamları mikroasiste fertilizasyon yolu ile ZP'yi geçmeyi denemişlerdir. Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD), Subzonal inseminasyon (SUZİ) 1992'li yıllar öncesindeki mikrofertilizasyon uygulamalarındandır. Tek bir spermin SUZİ uygulamaları sırasında oosit oolemması içine kaçması ile tesadüfen oluşan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası başarılı erken gebelik oluşması, yardımcı üreme tekniklerinde yeni bir çığır açmıştır.

Zona Drilling ve Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD): Zonada bir açıklık meydana getirildikten sonra klasik IVF deki gibi inseminasyonun yapılmasıdır.

Subzonal İnseminasyon (SUZİ): Spermlerin zona pellusidayı aşmasına gerek kalmaksızın doğrudan perivitellin aralığa bırakılmasıdır (66).

Mikroenjeksiyon (ICSI): Tek bir spermın mekanik yolla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesidir (28).

2.2.1. Time-lapse

Tüp bebek işleminde transfer için embriyo seçimi en kritik basamaktır. Gebelik şansını arttırmak için doğru embriyonun seçilmesi çok önemlidir. Time-lapse (Tam zamanlı izleme sistemi), embriyolardaki hiçbir değişimi gözden kaçırmayan gelişmiş kamera sistemidir. Embriyolar sürekli izlendiği için bölünme zamanları kesin olarak tespit edilir. Embriyoların gelişimleri film olarak saklanır. Bu sayede embriyoların görüntü kayıtlarından kritik zaman noktaları kaydedilmiştir. Aynı zamanda Time-lapse, her hastanın tüm embriyolarının gelişimi hakkında karşılaştırmalı bilgiler, hatta daha önceki tedavilerindeki embriyo gelişimleri ile karşılaştırmalı olarak sunar. Herhangi bir detay gözden kaçırılmadan, embriyoları tekrar tekrar izleyebilme imkanı ve hatta gerektiğinde farklı embriyologlar ile birlikte izleyerek transfer edilecek ve dondurulacak embriyoların seçilmesine izin verir. Time-lapse, invaziv olmayan, embriyo seçimi için kullanılan kameralı bir sistemdir. Her 15 dakikada bir embriyoların beş farklı seviyede fotoğraflarını çekerek bilgisayar ortamında depolar. Bu sistem IVF laboratuvarlarında detaylı embriyo gelişim kinetiklerinin incelenmesine olanak vermiştir (29).

Standart inkübatörde morfolojik değerlendirme kritik zaman noktaları sınırlıdır, normalde embriyolar her gün bir kez buldukları ortamdan çıkarılıp, mikroskop altında incelenerek embriyo seçimine karar verilir. Fakat değerlendirmek için inkübatör ortamından uzaklaşan kültür petrisindeki sıcaklık ve pH değişimi istenmeyen bir durumdur (30). Oysa time-lapse'de, embriyolar hiç dış ortama çıkarılmadan değerlendirilerek embriyo seçimi yapılır ve embriyo morfokinetiği hakkında detaylı bilgiler verdiği için oldukça önemlidir (31).

Time-lapse araştırmaları, polar body atılımı ve pronükleus oluşum mekanizmasının anlaşılmasına olanak sağlamıştır ve fragmentasyonların geri

dönüşümlü olduğuna kesin kanıt sağlamıştır. Pronükleusların erken kaybolması ve erken bölünen embriyoların 2. günde daha fazla blastomere sahip olacağı bulunmuştur (4).

2.3. İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (ICSI) VE SONRASINDA DEĞERLENDİRİLEN PARAMETRELER

2.3.1. ICSI

Erkek infertilitesinin tedavisinde çığır açan ICSI ile, daha önceden başarısız olunmuş IVF denemeleri olan veya ciddi derecede bozuk sperm parametreleri bulunan infertil hastalarda fertilizasyon ve gebelik elde edebilme şansı ortaya çıkmıştır (18). ICSI, tek bir sperm hücrenin zona pellicuda ve oolemmayı atlayarak, oosit sitoplazmasına enjeksiyon işlemidir. İleri derecede anormal semen parametrelerine sahip, epididimden veya testisten cerrahi yöntemlerle elde edilen spermelerin kullanıldığı işlemlerde, ileri kadın yaşı ve oosit sayısının az olması gibi düşük fertilizasyon riski taşıyan hastalarda ICSI işlemi tercih edilir (70).

2.3.2. ICSI Sonrası Embriyo Değerlendirme Parametreleri

Yardımla üreme teknolojilerinin kullanılmaya başlandığı ilk yıllardan beri üzerinde birçok araştırma yapılmasına karşın, ilerlemenin oldukça sınırlı kaldığı konuların başında implantasyon potansiyeli yüksek embriyonun belirlenmesinde kullanılacak kriterlerin tanımlanması gelmektedir. Günümüzde 2 ya da 3. gün geleneksel yöntemlerle seçilen ve birden fazla embriyo verilen transferlerde embriyoların yaklaşık %80'i implante olmamaktadır. Erken bölünme ve pronükleus morfolojileri gibi göreceli olarak daha yeni parametrelerin kullanımı ile implantasyon oranı, embriyo başına yaklaşık %30 dolaylarına kadar arttırılabilmektedir. Kompaktlaşma ve sonuçta blastosöl boşluğu oluşumunda büyük önemi olan blastomer kutuplaşma parametreleri de, 4 blastomerli ve 8 blastomerli embriyolarda kullanarak pronüklear puanlama ile birlikte önem kazanmıştır. Hücre

sayısı ve morfolojisine dayalı embriyo seçim kriterleri kullanılarak yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda, embriyo seçiminin 2. veya 3. günde yapıldığı belirtilmektedir. Bavister tarafından da belirtildiği gibi, seçim kriterleri belirlenirken en önemli faktörlerden biri embriyoların karşılaştırılacağı kesin zaman noktalarının saptanmasıdır (32).

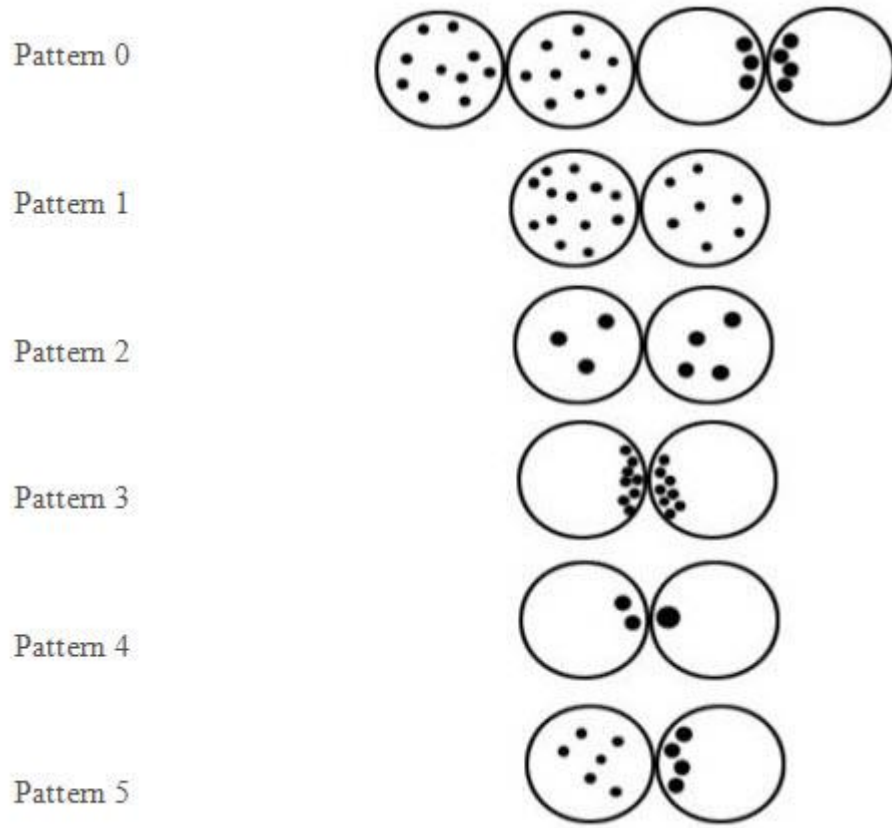
İmplant olacak embriyoyu tahmin etmek için sadece morfoloji değil time-lapse ile embriyo gelişim kinetiği diğer seçim kriteri olarak eklenmiştir (33, 34). Time-lapse sayesinde embriyoyu dış ortama çıkarmadan, fertilizasyondan transfer edileceği güne kadar olan zamanda nasıl geliştiği izlenerek, transfer için en iyi performans gösteren embriyo seçilir (35).

Embriyolar değerlendirilirken en iyi kaliteye sahip denilebilmesi için gerekli özellikler belirlenmiştir. Bunlar; fertilizasyondan sonra 2. günde dört veya beş blastomer ve 3. günde en az yedi blastomer, multinükleer blastomer bulunmaması ve fertilizasyondan sonra 2. ve 3. günde <math><20\%</math> fragmentasyon oluşması (36).

Çoğul gebeliklerin önlenmesi ancak transfer edilen embriyo sayısının azaltılması ve hatta tek embriyo transfer edilmesiyle mümkündür. En iyi kalitede embriyonun transfer edilebilmesi için kritik zaman noktaları ve embriyonun her aşamasında nasıl ilerlediğinin bilinmesi çok önemlidir.

2.3.2.1. Pronükleer Değerlendirme

Mikroenjeksiyon işleminden 16-18 saat sonra, anne ve babadan gelen kromozomları taşıyan 2 çekirdek yumurta ortasında oluşmaya başlar. Dişi pronükleus erkek pronükleusa iyice yaklaşıp kadar ilerler ve bitişirler. Yumurtanın ortasında 2 çekirdeğin izlenmesi, oositin döllendiği anlamına gelir. Yapılan çalışmalar, pronükleer oositlerin morfolojik olarak normal olarak değerlendirilebilmeleri için her iki PN'in sitoplazmada merkezi pozisyonda, birbirine yakın ve eşit büyüklükte olması gerektiğini göstermiştir (37).



Şekil 1. Tesarik ve Greco pronükleus puanlama sistemi.

Tesarik ve Greco puanlama sistemine göre P0 en yüksek P5 ise en düşük implantasyon potansiyeline sahiptir.

Kutup cisimciği, perivitellin aralıkta bulunan ve mayoz bölünme sırasında ortaya çıkan bir yapıdır. Kutup cisimciğinin görülmesi yumurtanın olgun olduğunu gösterir. Çekirdeklerin kutup cisimciği ile yaptıkları β açısının küçük olması embriyonun implantasyon potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir (38).

Sitoplazmik halo, yumurtanın çevresinde görülen az yoğun bölge olarak tanımlanır. Bu yapının varlığı embriyonun implantasyon potansiyelinin yüksek olduğunu gösteren bir bulgudur (39).

Optimum implantasyon potansiyelinin belirteci olarak önerilen kriterler şöyledir:

- Nükleolusların bir tarafta birbirine yakın olarak sıralanması
- Pronükleusların eşit ayrılması
- Belirgin bir halo ile heterojen bir sitoplazma

- 24-26. saatlerde erken bölünme (26).

2.3.2.2. Bölünme Evresi Değerlendirme

Erken Bölünme

Sakkas ve arkadaşları, inseminasyon veya mikroenjeksiyon sonrası 25. saatte 2 hücreli evreye bölünmeyi embriyo seçimi için kritik zaman noktası olarak almıştır (40). İnseminasyondan 25-27. saat sonra oluşan erken klivajın transfer için yaşama kapasitesi olan embriyoların seçiminde çok etkili olduğu bilinmektedir. Fakat doğru erken bölünmenin görülebilmesi için sadece kısa bir aralık vardır ve bunu bir IVF laboratuvarında rutine oturtmak zor olabilir. Time-lapse ile birlikte, erken bölünme zamanları da kaçırılmadan gözlemlenebilir (26).

Fertilizasyondan 24-28 saat sonra ilk bölünmenin gerçekleşmediği embriyolar transfer günü iyi bir morfolojiye sahip olsalar bile daha düşük implantasyon oranlarına sahip olurlar. Erken klivaj gösteren zigotların daha senkronize ve sitoplazmik ve nükleer olgunlaşması olan oositlerden kaynaklandığı düşünülür (41).

Multinükleasyon

Multinükleasyonu olan blastomerler erken bölünme aşamalarında, en kolay 2. gün gözlemlenebilirler. Blastomerlerinde multinükleasyon görülen embriyoların transferi, azalmış implantasyon, gebelik ve doğum oranlarıyla ilişkili olabilir, mümkün olduğunca bu embriyolar transfer için seçilmemelidir (Meriano et al. 2004, Hnida ve Ziebe 2007).

Bölünme Hızı

Bölünmenin zamanında gerçekleşmesi ve sürekli olması embriyonun canlılığını gösteren önemli bir özelliktir. İyi kaliteli bir embriyonun, 2. günde (44-48. saat) 2-5 blastomer ve 3. günde (64-72. saat) 6-10 blastomere sahip olması

gerekmektedir . Yapılan çalışmalarda, time-lapse'de implantasyon başarısı açısından kullanılan parametrelerden en önemlileri; t2 (24.3-27.9 h), t3 (35.4-40.4 h), t5 (48.8–56.6 h), cc2 (\leq 11.9 h), s2 (\leq 0.76 h)'dir (42,43).

Yapılan çalışmalar, çok yavaş ya da çok hızlı embriyo gelişiminin embriyo implantasyon oranlarını olumsuz yönde etkilediğini göstermişlerdir (44).

Embriyo Kalitesi

Embriyo kalitesi değerlendirilirken, blastomerlerin biçim ve büyüklüğü sitoplazmik özellikleri ve fragmantasyon oranı gibi özellikler dikkate alınır. Embriyolar bütün bu özelliklerin birlikte değerlendirildiği çeşitli embriyo kriterlerine göre sınıflandırılırlar. Eşit olmayan hücresel bölünme, embriyo kalitesi ve embriyonun gelişim kapasitesi ile ilgili bilgi veren bir parametredir. Yapılan çalışmalar, eşit bölünmeyen embriyoların transferiyle gebelik ve implantasyon oranlarının olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir (35).

Embriyonun içinde bulunan ve hücre olmayan yapılar fragman olarak adlandırılır. Çekirdeği olmayan fragmanların sayısı ve miktarının embriyo hacmine oranı, embriyo kalitesi belirlenirken değerlendirilmelidir. Hücre fragmantasyonunun nedeni ve embriyo gelişimine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte hem embriyo hem de hastaya özgü bir durum olarak ortaya çıkabilmektedir (26).

Sitoplazma, açık renkli, şeffaf ya da hafif granülasyona (süngerimsi yapı) sahipse, normal olarak değerlendirilmektedir.

Embriyolar puanlanırken perivitellin alandaki (sitoplazma dışı alan) genişlik, darlık ve inklüzyonlar not edilmekte, zona pellusida (dış kabuk) yapısı ve kalınlığı da değerlendirilmektedir (45).

2.3.2.3. Blastosist Evresinde Embriyo Değerlendirilmesi

Bazı durumlarda embriyolar blastosist olarak adlandırılan evreye kadar (5. ve 6. gün) laboratuvarında geliştirilmektedirler. Blastosist kültüründe amaç, gelişen

embriyolar arasından en iyi kalitede ve implantasyon potansiyeli en yüksek embriyonun seçilmesine olanak tanınabilmesidir (46).

Bölünme evresindeki embriyolarında olduğu gibi blastosist değerlendirme ve seçiminde de zaman ve morfoloji çok büyük öneme sahiptir. Blastosist puanlama sisteminde embriyonun genişleme derecesi, iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesinin hücrelerinin yoğunluğu esas alınır (43). İyi kaliteli bir blastosistin, mikroenjeksiyondan yaklaşık 112-114 saat sonra belirli ve geniş (embriyo hacminin en az yarısı kadar) bir blastosöle (orta boşluk), belirli bir iç hücre kitlesine ve düzgün ve sık yerleşmiş dış hücre kitlesi hücrelerine sahip olması gerekmektedir. Gardner ve arkadaşları kaliteli bir blastosistin implantasyon ve gebelik oranlarını olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir (47).

Yeni jenerasyon kültür medyumlarının gelişmesi sonrasında tek blastosist transferi hem tüp bebek başarısını arttırmak için hem de çoğul gebelikleri azaltmak için öne sürülmeye başlanmıştır (Gardner et al. 1998).

Uygun embriyo seçildikten sonra 2, 3 ya da 5. gün anne adayının uterusuna bir katater yardımıyla yerleştirilir. Transfer işleminden 12 gün sonra kanda β -hCG değeri ölçülerek gebelik olup oluşmadığı kontrol edilir (26).

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

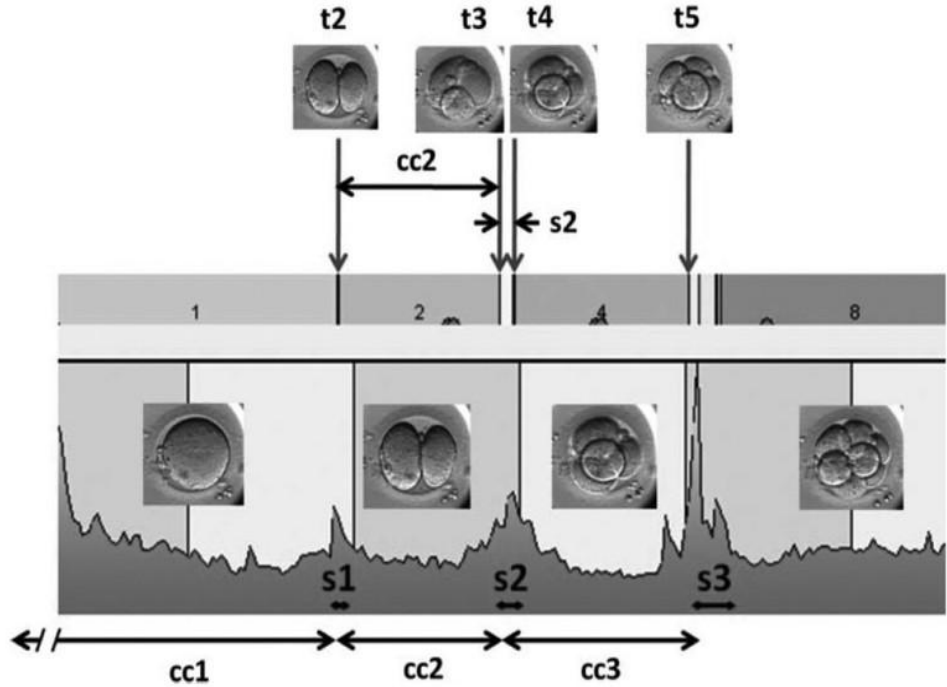
ÜRÜN	MARKA	KATALOG NO
G-MOPS	Vitrolife	10129
G-IVF	Vitrolife	10136
G-1	Vitrolife	10127
G-2	Vitrolife	10131
HSA	Vitrolife	10064
G-rinse	Vitrolife	10069
Hyase 10X	Vitrolife	10017
Ovoil	Vitrolife	10026
ICSI	Vitrolife	10111

3.2. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışmaya çocuk sahibi olmak için 2011-2014 yılları arasında Eurofertil Tüp Bebek Merkezi'ne başvurup ICSI programına alınan 164 çift dahil edilmiştir.

Araştırma evrenini oluştururken erkek partnerlerde 18 yaş ve üzeri olması, 1. grup için açıklanamayan infertilite hastalarından normozoospermi olanlardan 82 çift, 2. grup için azospermi olanlardan 82 çift çalışmaya dahil edilmiştir. Kadın partnerlerde ise yaşı 19-39 arası olması, herhangi bir endikasyon olmaması, 4 ve üzeri yumurta toplanan hastalardan olmasına dikkat edilerek seçilmiştir.

Çalışmamız toplamda 224 adet implantasyonu bilinen transfer embriolarına ait veriler ile yapılan retrospektif bir çalışmadır. İki embriyo transfer edilen hastalarda iki embriyonda implante olduğu bilinen hastalar dahil edilmiştir. Kliniğimizde time-lapse kullanılan hastalardan 2 grup olarak seçilen normozoospermi olup açıklanamayan infertil vakalar ve azoospermi vakaların embriyo görüntüleri izlenerek yapılmıştır. Embriyolar bölünme saatlerine göre değerlendirilmiştir. Time-lapse’de normozoospermi olan açıklanamayan infertil hasta grubu ve azoospermi hasta grubu transfer embriolarının t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, cc2, s2, cc3 parametreleri kaydedildikten sonra istatistiksel analiz yapılmıştır.



Şekil 2. Embriyo gelişimi sırasında t2, t3, t4, t5, cc2= t3-t2, s2= t4-t3 parametrelerinin grafikte gösterilmesi.

Embriyoların morfokinetiği, time-lapse’de incelenerek 2 grubun embriyoları arasında fertilizasyon oranları, ilk klivaj zamanı (25-27. saat), 2. gün (44-48. saat) ve 3. gün (64-72. saat) bölünme zamanları bakımından fark olup olmadığı ve bunların gebeliğe etkisi araştırılmıştır. Ayrıca gebelik ve implantasyon oranları 2 grup arasında karşılaştırılmıştır. Kullanılan tüm verilerle ilgili etik onay alınmıştır.

3.3. HASTALARA UYGULANAN İŞLEMLER

Kliniğimize başvuran erkek partnere spermiyogram testi yapıldı. Kadın partnere ise birden fazla yumurta elde edebilmek için ovaryan stimülasyon uygulandı.

Semen Analizi

3-5 günlük cinsel perhiz süresinin ardından mastürbasyon yoluyla steril örnek kabına verilen semen örneği, oda sıcaklığında 10-15 dakika likefiye olana kadar bekletildi. 5'lik enjektör yardımıyla semen örneğinin hacmi belirlendi.

Likefiye olmuş semen örneğinden Makler Chamber üzerine 10 µl semen örneğinden konularak 20X'de ışık mikroskopunda değerlendirildi. Makler Chamberda bir sütundaki 10 karede bulunan tüm sperm (motil ve immotil) sayılarak kaydedildi. Bu total konsantrasyonu gösterir. 10 karedeki motil tüm sperm sayılarak kaydedildi.

Aşağıdaki derecelendirilmeye göre 10 karedeki A ve C sperm sayılarak kaydedildi. En az iki kez ve her defasında en az iki sütun sayılarak kaydedildi.

A+B: İleri doğru hareketli

C: Yerinde hareketli

D: Hareketsiz

Mikro TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu)

Semen örneği incelenirken Makler Chamberda hiç sperm görülmezse, lam üzerine 20 µl semen örneği konularak üzeri lamel ile kapatıldı. Preparat 40X'de ışık mikroskopunda incelendi, motil veya immotil sperm arandı. Şayet preparatta hiç sperm görülmezse; konik falcon tüpün (Falcon 2095) üzerine hastanın ismi ve soy ismi sabit kalemle yazılıp, semen örneğinin tümü enjektör yardımıyla tüp içerisine boşaltıldı. Ağzı sıkıca kapatılan tüp 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj

sonrası supernatant kısmı döküldü. Pellet kendi sıvısı ile resüspanse edildi. Lam üzerine resüspanse edilen sıvıdan 20 µl konularak lamel ile kapatıldı. Örnek ışık mikroskopunda 40X'de incelendi. En az dört preparat bakıldı. Eğer hiç motil ve immotil sperm görülmezse hasta azospermi olarak değerlendirildi. İşlem gününden önce yapılan spermiyogram testi sonucu azospermi olan hastalara TESE ameliyatı önerildi.

Mikro TESE, erkek infertilitesinde hiç sperm bulunmadığı durumlarda gerçekleştirilen bir operasyondur. Operasyon sırasında erkek testislerinden toplam 8 doku alındı. Mikro cerrahi yöntemle testisten alınan dokular centerwell içerisindeki G-IVF medyumunda iki adet PPD enjektörü ile disseke edilerek lam lamel ışık mikroskopunda 40X objektifte sperm arandı. Sperm görülmesi durumunda alınan doku parçaları visotüpe toplanıp üzerine 600 µl sperm freezing medyum damla damla konuldu. Her damladan sonra örnek karıştırıldı. Kapağı sıkıca kapatılan nunc tüp birkaç kez ters düz edildi. Sperm freezing medyum eklendikten sonra 3 dakika oda ısısında beklendi. Örnekler aliminyum folyo ile ışık geçirmeyecek şekilde sarıldı ve +4'e buzdolabına yerleştirildi, burada da 45 dakika bekletildi. Sonra sıvı nitrojenden 4 cm yukarıda, buharında 10 dakika bekletildikten sonra sıvı nitrojen içerisine daldırıldı. Örnekler cane'lere sıvı nitrojen içerisinde yerleştirilerek taşıyıcı kanistere, buradan da depo tank içerisindeki yerine yerleştirildi.

Ovaryan Stimülasyon

Tüm hastalarda antagonist protokol kullanıldı. Ovaryan stimülasyon, GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) antagonist (Cetrotide 0.25 mg; Merk Serono, Bari, Italy) ile adet 2-3. günleri başlandı.

Overlerin tedaviye yanıtı, ultrason taramaları ve serum östradiol seviyelerinin ölçülmesiyle takip edildi. Foliküller en az 13-14 mm çapına ulaştıklarında ve östrojen seviyesi istenilen seviyeye geldiğinde hCG (insan koryonik gonadotropini) enjeksiyonu uygulandı. HCG (Ovitrelle; Merck Serono, Bari, Italy) enjeksiyonundan sonraki 36. saatte oositler toplandı.

ICSI

0.gün

İşlem günü kadının oositleri toplanırken erkekten alınan sperm önce sayısal olarak değerlendirildi. Daha sonra da ICSI işleminde kullanılmak üzere yıkandı. TESE olan hastaların önceden dondurulmuş TESE dokularından çözüldü ve sperm hazırlandı.

ICSI İşleminde Kullanılmak Üzere Spermilerin Hazırlanması

Normal ejakülat spermi ile ICSI yapacağımız hastalardan alınan semen örnekleri sayısal olarak değerlendirildi. Tüpe 1 ml G-IVF ve 1 ml likefiye olmuş semen örneği konulup vortekslendi. Santrifüje yerleştirilen tüpler 10 dakika 500 g'de santrifüj edildi. PPD enjektörünün ucuna sarı iğne ucu takılıp, bunun yardımıyla pellete zarar vermeden supernatant alınarak atıldı. Yeni bir PPD enjektörüne sarı iğne ucu takılarak her tüpe sperm sayısına göre 0,1-0,5 ml arası G-IVF stok çekildi. Eğik tutulan tüpe, pellete zarar vermeden medyum konuldu. Medyum miktarı sperm sayı ve motilitesine göre değişir. Tüpler 45 derece eğimli olacak şekilde spora dikkatlice yerleştirildi. Yaklaşık 30 dakika geçtikten sonra PPD enjektör yardımıyla sarı iğne ucu pellete yaklaştırılmadan yüzen sperm ve medyum çekilip yeni bir tüpe konuldu. İşleme kadar deskin üzerinde bekletildi.

TESE sperminin hazırlanması ise, ponksiyon günü hastanın eşinin işlemi bittikten sonra TESE materyali çözüldü.

Hastanın protokolüne göre örnek bulunarak pens yardımıyla alındı ve 37 °C deki su banyosunda yaklaşık 5 dakika çözülene kadar bekletildi. Çözülen disseke ise; küçük falcon tüpün üzerine hastanın adı soyadı, eşinin adı soyadı yazıldı. Nunc içerisindeki materyalin hepsi bu tüp içerisine döküldü. PPD enjektörüne bir gün öncesinde hazırlanmış G-IVF'ten 1 ml çekilerek damla damla bu solüsyona eklendi. Her damlada solüsyon iyice karıştırıldı. Küçük falcon tüpün kapağı sıkıca kapatıldı. Vortekste karıştırıldı. Karışım 500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Centerwell'in üzerine hastanın, eşinin adı soyadı yazıldı. Küçük falcon tüp içerisindeki supernatant atıldı. Pelet 1 ml G-IVF ile dilüe edilerek centerwell içerisine döküldü. İki adet PPD

enjektörü yardımıyla doku disseke edildi. 30 dakika beklendikten sonra centerwell içerisindeki sıvı kısım alınarak küçük tüp içerisine konuldu ve 1800 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılıp pelet 1 ml G-IVF ile santrifüj edildi. Supernatant tekrar atılarak pelet 300 µl ile resüspanse edildi ve deskte bekletildi.

Total immotil sperm bulunan ve çözündürme sonrası motil sperm görülemeyen TESE vakalarında 250 µl örneğin içine 50 µl önceden ısıtılmış sperm mobil eklendi. 5 dakika kadar inkübatörde bekletildikten sonra sperm toplama işlemine geçildi. Sperm mobil uygulaması sonrası sperm motilitesi yaklaşık 40-45 dakika sürmektedir.

Oosit Toplama İşlemi (OPU)

Tüm basamaklarda embriyo kültürü medyumunu olarak (Vitrolife; Göteberg, Sweden) kullanıldı. HCG enjeksiyonundan sonraki 36. saatte oositler transvajinal olarak ultrasonografi eşliğinde ve yıkama medyumunu G-MOPS kullanılarak toplandı. Aspirasyon iğnesi yardımıyla kadın doğum uzmanı tarafından toplanan oositleri içeren folikül sıvısı büyük falcon tüp içine alındı. Büyük falcon tüp içerisinde getirilen folikül sıvısı hemen Falcon 60 mm'lik petri içerisinde döküldü. 200'lük pipet yardımıyla tespit edilen oositler alınarak yıkama petrilerinin (centerwell) çevresindeki G-MOPS medyum içerisinde yıkandı ve merkezi kısımda toplandı. OPU işlemi bitip, tüm folikül sıvıları kontrol edildikten sonra; toplanan oositler bir gün öncesinden hazırlanan G-IVF petrisinin kenarında yıkanıp, ortadaki yağ altı 1 ml'lik G-IVF içerisine yerleştirildi. Tüm folikül sıvıları hızlı bir şekilde kontrol edildi. Kontrol edilen folikül sıvıları, farklı bir kişi tarafından bir kez daha kontrol edildikten sonra atıldı.

G-IVF petrisi içerisinde toplanan oositler, 1-2 saat 37°C'lik, %5 CO₂ içeren ve %90 nem ortamı sağlayan inkübatörde bekletildi.

ICSI İşlemi İçin Oositlerin Temizlenmesi (Hyase)

ICSI yapılabilmesi için oositin etrafındaki korona ve kumulus hücrelerinin temizlenmesi gerekir. Bu işlem denüdasyon olarak adlandırılır.

Hyase (IU:20), falcon 60 mm'lik petride ve yağ altında yapıldı. Hastanın yumurta sayısına göre petri sayısına karar verildi. Hyase'dan 15 dakika önce 1500 µl G-MOPS stok ve 150 µl Hyase stoktan ısıtma inkübatörüne kaldırıldı. Medyumlar ısındıktan sonra Falcon 60 mm'lik petriye 4 adet 50µl G-MOPS stok damlaları ve 150 µl Hyase damlaları hazırlandı. Petri hazırlandıktan hemen sonra üzeri ısıtma inkübatöründeki yağ ile kapatıldı. Hazırlanmış petri tekrar ısıtma inkübatörüne kaldırıldı, medyumlar ve yağ regülasyonu için 10 dakika kadar beklendi. Ardından ICSI petri hazırlandı. G-MOPS medyundan gerekli olan miktarda kullandıktan sonra tekrar ısıtma inkübatörüne kaldırıldı, ICSI petrisi hazırlarken kullanıldı.

Ayıklama işlemi için 135µl lik stripper kullanıldı. 100'lük pipet yardımıyla alınan oositler hyase stok damlalarına yerleştirildi. Oositler pipete alınıp verilerek kabaca kumulus hücrelerinden temizlendiler. Daha sonra stripper yardımıyla kumulus hücreleri mekanik olarak temizlendi. Hyase stok içerisinde kısmen temizlenen oositler G-MOPS yıkama damlaları içerisine alındılar. Stripper yardımıyla kumulus hücrelerinden tamamen temizlenene kadar oositler G-MOPS damlalarında sırasıyla denüstasyon yapıldı. Temizlenmiş oositler buradan, daha önceden hazırlanmış olan ICSI petrisine yerleştirildi. ICSI sırasında oositlerin matürasyonları değerlendirilip kaydedildi.

Oositin İncelenmesi

Kutup cisimciği olan olgun oositler Metafaz II (MII), kutup cisimciğini atmamış tek hücre görünümünde olan olgunlaşmamış oositler Metafaz I (MI) olarak değerlendirildi. Kutup cisimciği olmayan ve germinal vesikül görülenler olgun olmadıkları için ICSI işleminde kullanılmadı.

ICSI (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

Oositler temizlendikten sonra MII olanlar ile Van Steirteghem ve arkadaşlarının protokolüne uygun olarak mikroenjeksiyon işlemi yapıldı (34). ICSI petrisi Nunc ICSI Dish/centerwell kapağına hazırlandı. Petrinin ortasından aşağıya doğru damlacıklar hazırlandı. Petrinin ortasına, alt alta iki adet 15 µl PVP

(Polivinilpirolidon) konuldu. Bu damlaların üzerine iki adet, altına da 4 adet 15 µl G-MOPS stoktan konuldu. Damlacıkların üzeri Ovoil ile kaplandı. ICSI petrisindeki üst kısımdaki iki G-MOPS ve altındaki PVP damlasına sperm sayısına göre 1-10 µl sperm solüsyonundan eklendi. Her bir G-MOPS damlasına bir oosit yerleştirildi. ICSI petrisi invert mikroskoba yerleştirildi. Pipetler yavaşça boş PVP damlasına indirildi. Önce holding pipete sonrada ICSI pipetine bir miktar PVP çekilerek damlacığın dışına çıkartıldı. Spermilerin bulunduğu PVP damlacığındaki spermilerden morfolojisi iyi olan spermiler seçilerek, kuyrukları ICSI pipeti yardımıyla ezilerek hareketsiz hale getirildi. Hareketsiz hale getirilen sperm pipet içerisine alındı. Holding pipet ile oosit tutularak sabitlendi. Oositi polar body'si saat 12:00 veya 06:00 hizasında olmalıdır. Oosit, holding pipet ve ICSI pipeti net hale getirildi. Saat 03:00 hizasından ICSI yapıldı. Sperm ICSI pipetinin uç kısmına kadar getirildikten sonra oosit içerisine girildi. Sperm ile birlikte ooplasma bir miktar geri çekildi. Ooplasma birden geri geldiğinde sperm ve ooplasma, oositin içerisine boşaltıldı. Oositin içerisine mümkün olan en az miktarda PVP verildi. Daha sonra ICSI pipeti içerisindeki akım durduruldu. Alınan diğer oositlerde enjekte edildikten sonra, enjekte edilen oositler bir gün önceden hazırlanmış G-IVF petrisine alındılar. G-IVF petrisinde, öncelikle ortadaki yıkama damlacıklarında birkaç kez yıkandıktan sonra her bir damlacığa bir oosit yerleştirildi ve petri inkübatöre kaldırıldı.

1.gün

Fertilizasyon

ICSI uygulanan oositler enjeksiyondan 16-18 saat sonra fertilizasyon açısından değerlendirildi. Her bir oositte pronükleus olup olmadığı ve sayısı açısından değerlendirildi. 2 pronükleus varlığı normal fertilizasyon olarak değerlendirilir. Pronükleusların büyüklükleri eşit olmalıdır. Bu takip için Tesarik ve Greco'nun skorlama sistemi kullanılır (48).

Tüm fertilize olan oositler özel dishlere (EmbryoSlide; Unisense FertiliTech, Aarhus, Denmark) aktarıldı ve transfere kadar 6.0% CO₂, 7.0% O₂ ve 37.0 °C ortamı olan

time-lapse inkübatöre (EmbryoScope; Unisense FertiliTech, Aarhus, Denmark) yerleştirildi.

Erken Klivaj

İnseminasyondan 25-27. saat sonra oluşan erken klivajın transfer için yaşama kapasitesi olan embriyoların seçiminde çok etkili olduğu bilinmektedir (49). Mikroenjeksiyondan 16-20. saat sonra fertilize olan oosit, 25. saatte veya öncesinde ikiye bölünme gerçekleştirmişse erken bölünen embriyo olarak değerlendirilmiştir. 25. saatten sonra bölünenler erken bölünmemiş embriyo olarak değerlendirilmiştir. Sakkas ve arkadaşları, bu nedenle inseminasyon veya mikroenjeksiyon sonrası 25. saatte 2 hücreli evreye bölünmeyi embriyo seçimi için kritik zaman noktası olarak almıştır (40).

2.gün

Embriyo değerlendirmesi yaparken kullanılan skollama sisteminde 2. ve 3. gün embriyoların bölünme hızı ve kalitesi değerlendirilmiştir. Embriyo bölünme hızı değerlendirilirken 2. gün (44-48. saat) blastomer sayısı 4 ve dörtten fazla olan embriyolar normal, dörtten az blastomeri olan embriyolar anormal bölünmüş embriyo olarak değerlendirilmiştir (50).

Kalite değerlendirilmesi için kullanılan skollama sistemine göre;

1. Kalite Embriyo: Blastomerler eşit büyüklükte, fragmantasyon oranı %20'den az ve blastomerlerde multinükleasyon yok
2. Kalite Embriyo: Blastomerler eşit büyüklükte, fragmantasyon oranı %20'den fazla
3. Kalite Embriyo: Blastomerler eşit büyüklükte değil, fragmantasyon oranı %50'den fazla
4. Kalite Embriyo: Blastomer büyüklüğü, sayısı ve fragmantasyon oranı ayırt edilemiyor şeklinde değerlendirilmiştir (51).

3. gün

İyi kalite embriyo çok sayıda blastomeri olup hiç ya da fark edilmez oranda fragmantasyon gösteren embriyodur. Uygun blastomer sayıları kültürün 2. gününde (44-48. saat) 4-6, 3. gününde (64-72. saat) 8-12'dir. Kalite değerlendirmesi için yine 2. günde yapılan değerlendirme kullanılmıştır. 3. günde yapılan morfolojik değerlendirmede 8 ve üzeri blastomer sayısı olanlar iyi embriyo olarak seçilir. Blastomerlerde nükleusların olup olmadığı, birden fazla nükleusu olup olmadığı not edildi. Transfere uygun embriyolar forma işaretlendi. Baştan beri her kritik zaman noktasında gerektiği gibi olan embriyolardan transfer için seçildi.

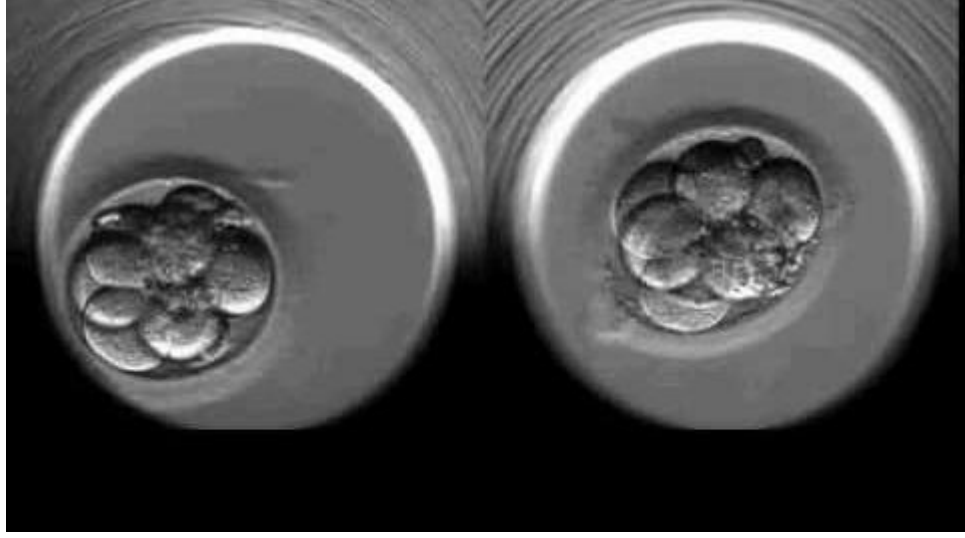
Transfer

Embriyolar ikinci günde (inseminasyondan 44-48 saat sonra), üçüncü günde (inseminasyondan sonra 64-72 saat sonra) veya blastosist döneminde 5-6. günde (inseminasyondan 114-120 saat sonra) transfer edilebilirler.

Anne yaşı, daha önceki deneme sayısı, embriyoların kalitesi, bölünme hızları ve embriyo sayısı göz önüne alınarak uygun olan embriyolar 2., 3., 5. gün embriyo transfer kateterine yüklenerek anne adayının uterusuna yerleştirildi.

Time-lapse'te Embriyoların İncelenmesi

Kliniğimizde 2011-2014 yılları arasında yukarıdaki işlemler rutin olarak yapılmıştır. Çalışmamızda, kliniğimize başvuran hastalardan seçilen normozoospermi ve azospermi hasta gruplarının embriyolarının görüntüleri time-lapse'de izlenerek embriyo morfokinetik parametreleri olan t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, cc2, s2, cc3 değerleri kaydedildi.



Şekil 3. Time-lapse’de embriyo görüntüleri.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi için Statistical Package for the Social Sciences 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA.) kullanıldı. Parametrik değişkenler student-t testi ile, parametrik olmayan değişkenler Man-Whitney U testi ile değerlendirildi. Gruplar arası gebelik oranlarının karşılaştırılmasında Chi-Square Test kullanıldı. Anlamlılık sınırı $P < 0.005$ olarak alındı.

4. BULGULAR

Merkezimizde 82 siklusta ejakülasyon menisinin spermleri ve 82 siklusta mTESE ile elde edilen spermlerle ICSI uygulanmıştır. Çalışmamızda toplam 164 hastadan 1914 adet oosit toplanmıştır ve olgun olan 1344 tanesine ICSI işlemi gerçekleştirilmiştir. Ejakülasyon grubunun ortalama anne yaşı 30,47 ve mTESE ile elde edilmiş sperm grubunun ortalama anne yaşı 29,6’dır.

ICSI işleminden sonra 1. grup olan normozoosperminin oositlerinden % 75,05’i ve 2. grup olan azosperminin oositlerinden %75,5’i fertilize olmuştur. Oositin fertilize olduğu sitoplazmasında 2 pronükleus ve 2 kutup cisimciği varlığı ile belirlenmiştir.

Embriyo kaliteleri grade 1 olan embriyolardan 2 grupta toplam 224 adet embriyo transfer edilmiştir (51).

Bulgular dikkate alınarak, normozoospermi ve azoospermi gruplarımızda sperm kaynağının, embriyo morfokinetiğine, implantasyon oranı ve gebelik oranlarına etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışma grupları arasında sonuçları etkileyebilecek faktörlerden olan sperm konsantrasyonu ve kadın yaşı benzer değerlere sahip bireylerden oluşturulmuştur.

Tablo 1. Demografik özellikler ve grupların klinik karakteristikleri.

	Grup 1	Grup 2	p
Hasta sayısı	82	82	
Anne yaşı	30,47±2,84	29,6±5,21	0,19
BMI (kg/m ²)	24,76±3,66	24,83±3,8	0,64
Oosit sayısı	11,46±6,5	11,88±5,47	0,28
Fertilizasyon oranı	75,05±20,51	75,5±24,04	0,29
Transfer edilen ortalama embriyo sayısı	1,32±0,47	1,41±0,49	0,19

BMI: Beden Kitle İndeksi, Grup 1: Normozoospermi Grup 2: Azoospermi

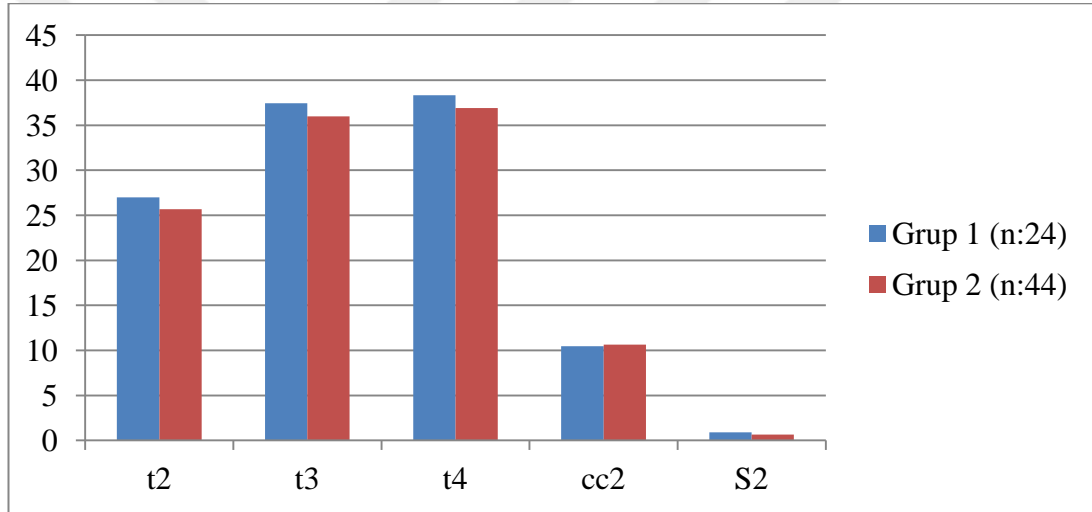
Her iki grupta da yaş, BMI, oosit sayısı, transfer edilen embriyo sayısı benzerdir.

Grup 1'in fertilizasyon oranı 75,05, grup 2'nin fertilizasyon oranı 75,5 olarak bulunmuştur. 2 grup arasında fertilizasyon oranlarında anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 2. Ejakülat spermi ve testiküler sperm ile ICSI sonrası elde edilen 2. gün transfer embriyolarının time-lapse’de morfokinetik parametrelerinin incelenmesi.

	Grup 1 (n:24)	Grup 2 (n:44)	p
t2	26,97±2,73	25,67±3,42	0,26
t3	37,42±4,59	35,98±4,04	0,19
t4	38,33±4,30	36,91±3,92	0,18
cc2 (t3-t2)	10,45±3,55	10,62±2,41	0,14
s2 (t4-t3)	0,9±2,05	0,66±0,93	0,45

Grup 1: Normozoospermi Grup 2: Azoospermi



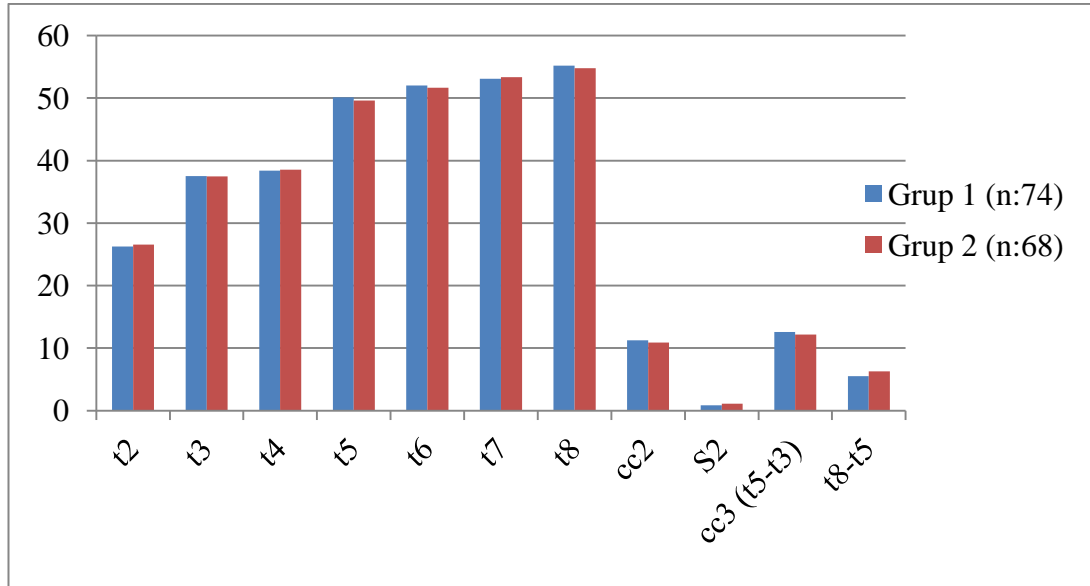
Şekil 4. 2. gün transfer edilen grup 1 ve 2 embriyolarının morfokinetik parametrelerinin karşılaştırılması.

2. gün transfer edilen grup 1 ve grup 2 embriyolarının embriyo morfokinetikleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 3. Ejakülat spermi ve testiküler sperm ile ICSI sonrası elde edilen 3. gün transfer embriyolarının time-lapse’de morfokinetik parametrelerinin incelenmesi.

	Grup 1 (n:74)	Grup 2 (n:68)	p
t2	26,25±2,36	26,54±2,97	0,52
t3	37,52±3,19	37,45±3,91	0,9
t4	38,37±3,4	38,55±4,02	0,77
t5	50,1±5,46	49,61±6,0	0,55
t6	52,0±5,36	51,65±5,11	0,67
t7	53,1±5,9	53,33±5,03	0,8
t8	55,2±6,64	54,8±4,82	0,88
cc2(t3-t2)	11,27±1,48	10,9±2,76	0,76
S2(t4-t3)	0,84±1,79	1,1±2,4	0,45
cc3 (t5-t3)	12,6±4,0	12,16±4,22	0,62
t8-t5	5,5±5,46	6,28±5,22	0,24

Grup 1: Normozoospermi Grup 2: Azoospermi



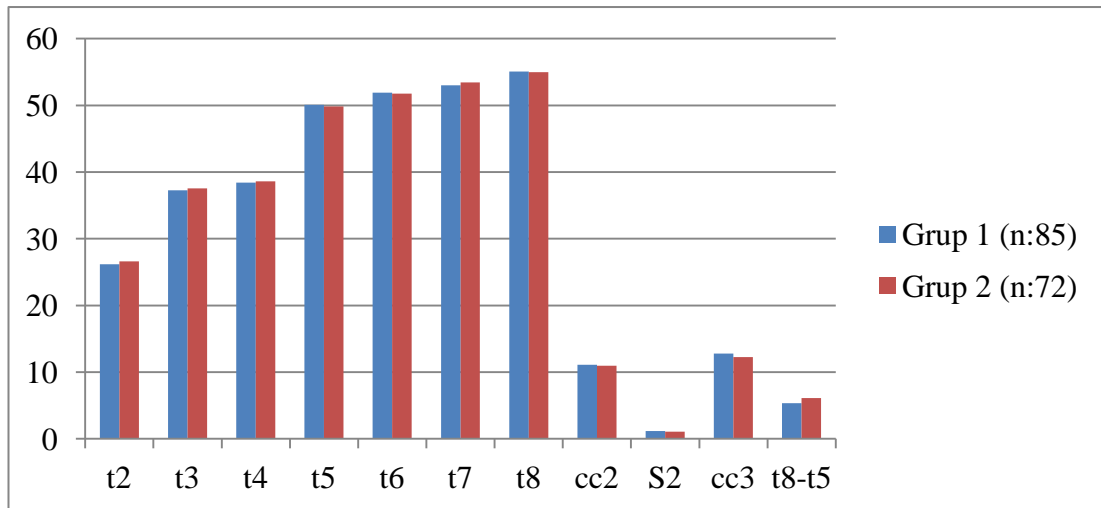
Şekil 5. 3. gün transfer edilen grup 1 ve 2 embriyolarının morfokinetik parametrelerinin karşılaştırılması.

3. gün transfer embriyolarının morfokinetikleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir.

Tablo 4. Ejakülat spermi ve testiküler sperm ile ICSI sonrası elde edilen 3. ve 5. gün transfer embriyolarının time-lapse’de morfokinetik parametrelerinin incelenmesi.

	Grup 1 (n:85)	Grup 2 (n:72)	p
t2	26,16±2,54	26,60±2,96	0,31
t3	37,26±3,24	37,55±3,92	0,61
t4	38,41±4,28	38,60±4,01	0,76
t5	50,05±5,38	49,81±6,01	0,79
t6	51,92±5,63	51,77±5,12	0,86
t7	52,99±6,1	53,41±5,03	0,65
t8	55,08±7,04	54,97±4,90	0,74
cc2	11,1±1,83	10,94±2,7	0,48
S2	1,15±3,6	1,05±2,34	0,5
cc3	12,8±4,2	12,26±4,14	0,46
t8-t5	5,36±5,4	6,1±5,15	0,23

Grup 1: Normozoospermi Grup 2: Azoospermi



Şekil 6. 3. ve 5. gün transfer edilen grup 1 ve 2 embriyolarının morfokinetik olarak karşılaştırılması.

5. gün transfer embriyolarının sayısı az olduğu için 3. gün embriyoları ile birlikte değerlendirilmiştir. 3. ve 5. gün transfer edilen embriyoların morfokinetikleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir.

Tablo 5. 2 grubun tüm transfer edilen embriyolarının Meseguer kriterleri ile karşılaştırılması (42).

	t2	t3	t5	cc2	S2
Grup 1	26,57±6,0	34,44±9,19	49,51±13,15	10,97	1,13
Grup 2	29,88±9,04	35,02±11,03	47,7±13,63	10,72	1,03
Meseguer kriterleri	24,3-27,9h	35,4-40,3 h	48,8-56,6 h	≤ 11,9 h	≤ 0,76 h

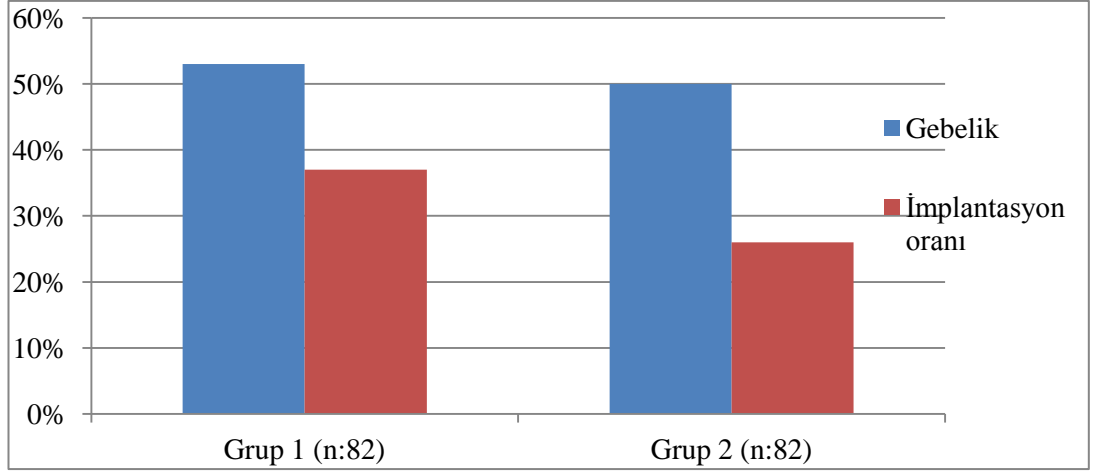
Grup 1: Normozoospermi Grup 2: Azoospermi

Meseguer'in ortalama değerlerine göre karşılaştırıldığında, 2. grubun embriyolarının ikiye bölünme zamanı (t2) daha geç olmuştur. S2: t4-t3, 3 blastomerden 4 blastomere geçiş süresini ifade eder. S2 değeri, her iki grupta da Meseguer ortalama değerlerine göre daha uzun sürmüştür.

Tablo 6. Gruplar arasında gebelik ve implantasyon oranının karşılaştırılması.

	Grup 1 (n:82)	Grup 2 (n:82)	p
Gebelik oranı	53%	50%	>0,005
İmplantasyon oranı	37%	26%	<0,005*

Grup 1: Normozoospermi Grup 2: Azoospermi



Şekil 7. Grup 1 ve Grup 2 transfer embriyolarının gebelik ve implantasyon oranları.

Grup 1'in gebelik oranı %53, grup 2'nin gebelik oranı %50 olarak bulunmuştur. Grup 1 ve 2'de gebelik oranları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,005$). Grup 1'in implantasyon oranı %37, grup 2'nin implantasyon oranı %26 bulunmuştur. Grup 1 ve 2'de implantasyon oranı bakımından anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,005$).

5. TARTIŞMA

Time-lapse, son yıllarda erken embriyo gelişim çalışmaları için güçlü bir teknoloji olmuştur. Kullanılan bu teknik ile, embriyo morfokinetiği değerlendirilerek sağlıklı embriyo gelişimi için birçok bilinmeyen açığa çıkarılmıştır (52). Şimdiye kadar bu sistemin kullanımına dair klinik sonuçlar sınırlıdır. İlk sonuçlar, 3. gün blastomer boyutları ve sayısının implantasyonu etkilediğini, embriyo implantasyon tahmininin bu sistemde geleneksel değerlendirme sistemine göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (Paternot et al., 2009). Tam zamanlı embriyo izleme sistemi ve kültür sistemi kombinasyonu gibi modern sistemlerden morfoloji ve embriyo gelişimi ile ilgili elde edilen ek bilgiler çoğalmaktadır (53).

Tek embriyo transferi yapılan ülkeler için, time-lapse ile birlikte en iyi embriyo seçim kriterleri önem kazanmıştır (54).

Kötü sperm parametrelerine sahip hastaların embriyo gelişimlerinin de etkilendiği sanılmaktadır. Fakat ICSI ile sınırlı sayıda ve iyi kalite spermler seçilir. Bu nedenle farklı semen kaliteleri ile yapılan ICSI sonrası benzer sonuçlar bulunmuştur. Embriyonik genomun aktive olduğu 4-8 blastomerli döneme kadar embriyoner gelişim maternal genom ve oosit proteinlerince yürütülür. Bu nedenle IVF uygulamalarında oosit morfolojisi kadar sperm özelliklerinin de etkisi incelenmektedir. Embriyonik genom aktive olmadan önce, sperm kalitesi embriyogenezin çok erken kısımlarını etkileyebilmektedir. Erkeğe bağlı problemler fertilizasyondan sonra ilk bölünme olana kadar etkilese de implantasyon öncesi gelişimi de etkilemektedir (9, 55).

Çalışmamıza benzer olarak, 63 hastada ejakülat ve testiküler sperm ile ICSI sonucu elde edilen embriyoların morfokinetik parametreleri incelenmiştir. Testiküler sperm grubu embriyoların daha hızlı bölündüğü gösterilmiştir (56).

Başka bir çalışmada, testiküler sperm ve normal ejakülat spermi ile yapılan ICSI sonucu elde edilen embriyoların morfokinetiği time-lapse kullanılarak incelenmiştir. Bu iki grupta spermin matürasyon farkından dolayı hücre bölünmelerinde farklılıklar olduğu düşünülmüştür. Testiküler sperm ile elde edilen

embriyoların 4 hücreli durumdaki süresi daha kısa olarak gözlenmiştir. Bunun aksine, testiküler sperm ile elde edilen embriyolarda 5 ile 6 ve 5 ile 8 hücreli zamanlar normal ejakülat spermine göre daha uzun olarak gözlenmiştir (57).

Azoospermi hastalardan elde edilen testiküler sperm ile yapılan ICSI, ejakülat sperm kadar etkili sonuçlar vermiştir (58). Testiküler sperm ile yapılan ICSI sonuçlarında implantasyon potansiyeli düşük olsa da fertilizasyon ve embriyo gelişimi etkilenmemiştir (59).

Epididimal veya testiküler sperm kullanılarak uygulanan ICSI ile fertilizasyon, implantasyon ve gebelik oranları arasında anlamlı farklılık yoktur. Ejakülat sperminde testiküler sperme göre DNA hasarı daha fazladır. Ejakülat sperminde yüksek DNA hasarı olan hastalarda başarısız ICSI sonrası testiküler sperm ile ICSI uygulanabilir (67,68). Hamileliğin devamının, spermin testiküler, epididimal veya ejakülat kaynaklı olmasından etkilenmediği geniş çalışmalarla gösterilmiştir (60, 61). Oligoasthenoteratospermi ile normozoospermi hastaların tedavilerinde implantasyon, gebelik veya düşük oranları arasında bir fark bulunmamıştır (62).

Yapılan başka bir çalışmada sperm kökeni ve kalitesinin fertilizasyon ve bölünme koşullarını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Bu çalışmada sperm kalitesinin ICSI sonuçlarını etkilemediği görülmüştür (63).

Diğer bir çalışmada, testiküler sperm ve oligoasthenoteratospermi olan hastaların ICSI sonucunda testiküler sperm grubunun fertilizasyon oranı daha düşük olmuştur. Sperm kaynağı, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını etkilememiştir (64).

Standart inkübatöre göre, time-lapse kullanılmasıyla stabil kültür koşulları ve embriyo seçimi için embriyo morfokinetiği sayesinde gebelik oranları yükselmiştir (65).

Çalışmamızda, 2 grubun embriyolarında sperm kaynağının fertilizasyon oranları, morfokinetik parametreleri, gebelik ve implantasyon oranlarına etkisi incelenmiştir. Fertilizasyon oranları, morfokinetik parametreleri, gebelik oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. 3. güne kadar klivaj üzerinde sperm kaynağının bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Gruplar arasında implantasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu farkın sperm matürasyonu bakımından olduğu düşünülmektedir. Testiküler sperm daha az olgundur, çünkü sperm matürasyonunun son basamağı epididimiste gerçekleşir. Bu nedenle mTESE ile sperm elde edilen grup 2’de implantasyon oranı daha düşük olmuştur. Embriyonik genomun aktive olduğu 4-8 blastomerli döneme kadar embriyoner gelişim maternal genom ve oosit proteinlerince yürütülür. 4-8 hücreli zamana kadar maternal genom, sonrasında embriyonik genom devreye girdiğinden dolayı testiküler sperm kullanılan 2. grupta sperm kalitesinin etkisi, implantasyon aşamasında ortaya çıkarak 2. grupta implantasyon oranının daha düşük olmasına sebep olmuş olabilir.

Bu verilere dayanarak, sperm kaynağı farklı olsa bile ICSI ile sınırlı sayıda ve kalitede spermier seçildiği için, fertilizasyon ve gebelik oranları arasında bir fark bulunmamıştır. Fakat sperm matürasyonunun etkisi implantasyon aşamasında ortaya çıkmış olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sperm kaynağı farklı olan normozoospermi ve azoospermi gruplar arasında fertilizasyon oranları, embriyo morfokinetiği, implantasyon ve gebelik oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmamıza 164 çift dahil edilmiş ve 2 grupta incelenmiştir. 1. grup açıklanamayan infertilite hastalarından normozoospermi olan 82 hastanın, 2. grup ise azoospermi olan 82 hastanın transferi yapılan toplam 224 adet embriyo seçilmiştir.

Bulgularımız doğrultusunda normozoospermi ve azoospermi infertil vakaların fertilizasyon oranları, time-lapse'de embriyo morfokinetiğinin karşılaştırma sonuçları ve iki grubun implantasyon ve gebelik oranları şöyle sıralanabilir.

- Grup 1'in fertilizasyon oranı 75,05, grup 2'nin fertilizasyon oranı 75,5 olarak bulunmuştur. 2 grup arasında fertilizasyon oranlarında anlamlı fark bulunmamıştır.
- 2. gün transfer edilen embriyolarda 2 grup arasında morfokinetik parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.
- 3. gün transfer edilen embriyolarda 2 grup arasında morfokinetik parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.
- 3. ve 5. gün transfer edilen embriyolar birlikte değerlendirildiğinde 2 grup arasında morfokinetik parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.
- İmplantasyon oranları incelendiğinde; 1. grupta %37, 2. grupta %26 olarak bulunmuştur. 1. grup olan normozoospermi hastaların ve 2. grup olan azoospermi hastaların implantasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür.
- Gebelik oranları incelendiğinde; 1. grupta %53, 2. grupta %50 gebelik elde edilmiştir. 2 grup arasında gebelik oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

Bu bulgular doğrultusunda, implantasyonu bilinen normozoospermi ve azoospermi transfer embriyolarında sperm kaynağının embriyo morfokinetiğine bir etkisi

olmadığı gözlenmiştir. Sperm kaynağının farklı olması sadece implantasyonu etkilemiştir. Fertilizasyon oranları, embriyo gelişimi ve gebelik oranlarını etkilememiştir.

Bu konuda yapılacak ileri ki çalışmalarda, 5. gün embriyo sayısının arttırılması ve hasta sayısının genişletilmesi böyle bir çalışmayı ve benzerlerini daha anlamlı kılacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- 1.** Gardner D. K., Weissman A., Howles C. M., Shoham Z. (2010). Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- 2.** Herrero J, Meseguer M (2013) Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertility and Sterility* Vol. 99, No. 4: s 1030-1034.
- 3.** Armstrong S, Vail A, Mastenbroek S, Jordan V, and Farquhar C (2015) Time-lapse in the IVF-lab: how should we assess potential benefit?. *Human Reproduction*, Vol.30, No.1: s 3–8.
- 4.** Vajita G., Hardarson T. (2012). Real-Time Embryo Monitoring Device for Embryo Selection. Z.P. Nagy et al. (eds.), *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices* DOI10.1007/978-1-4419-1780-5_48: 439-440.
- 5.** Palermo GD, Cohen J, Alikani M. (1995) Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril*;63:1231-40.
- 6.** Palermo GD, Schlegel PN, Hariprasad JJ. (1999) Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod* ;14:741-8.
- 7.** Delilbaş L. (2008) A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvarı. İstanbul: Veri Medikal Yayıncılık.
- 8.** Campbell N. A., Reece J. B. (2008). *Biyoloji* (s.980-989). Ankara: Palme Yayıncılık.
- 9.** Dacheux JL, Dacheux F. (2013) New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*. Dec 19;147(2):R27.
- 10.** Ramm S A, Scharer L, Ehmcke J, Wistuba J (2014) Sperm competition and the evolution of spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, Vol.0, No.0: s 1-10.

- 11.** Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, Janssenswillen C, Staessen C, Verheyen G, Camus M, Tournaye H, Devroey P (1998) Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* Apr;13 Suppl 1: s 134-42.
- 12.** Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. (1989) Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol*; 142: 62-7.
- 13.** Tsai C , Huang F, Wang L, Lin Y, Kung F, Hsieh C, Lan K (2011) Clinical outcomes and development of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using extracted testicular sperm or ejaculated extreme severe oligo-asthenoteratozoospermia sperm: a comparative study. *Fertility and Sterility* Vol. 96, No. 3, September :567-571.
- 14.** Meseguer M, Garrido N, Remohó J, Pellicer A, Simon C, Jabaloyas M, Gil-Salom M (2003) Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Human Reproduction* Vol.18, No.6: s 1281-1285.
- 15.** Tavukcuoglu S, AL-Azawi T, AL-Hasani S, Khaki A A, Tasdemir S (2013) Using Fresh and Frozen Testicular Sperm Samples in Couples Undergoing ICSI-MicroTESE Treatment. *J Reprod Infertil.*14(2):s 79-84.
- 16.** Esteves S C, Prudencio C, Seol B, Verza S Jr, Knoedler C, Agarwal A. (2014) Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility. *Asian Journal of Andrology* 16: s602–606.
- 17.** Altıntaş R., Durmaz A.A., Karamazak S., Tavmergen E., Onay H.,Altay A.B. (2011) Testiküler sperm ekstraksiyonu sonuçlarının AZF gen mutasyonları ile ilişkisi. *Türk Üroloji Dergisi - Turkish Journal of Urology*;37(3):229-234.
- 18.** Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyt. *Lancet*; 340(8810): 17-8.
- 19.** Glina S, Vieira M. (2013) Prognostic factors for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Clinics.*;68(S1):121-124.

- 20.** Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J. (2005) ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction* Sep;20(9):2590-4. Epub Jun 2:2591,2593.
- 21.** Sakkas D, Alvarez JG. (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome. *Fertil Steril.* Mar 1;93(4):1027-36.Epub Jan 18:1028.
- 22.** Göker E N, Sendag F, Levi R, Sendag H, Tavmergen E. (2002) Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Sep 10;104(2):129-36.
- 23.** Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. (1996) Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* Jan;11(1):127-32.
- 24.** Tesarik J, Greco E, Mendoza C. (2001) Assisted reproduction with in-vitro-cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study. *Hum Reprod.* Dec;16(12):2640-5.
- 25.** Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Nuhoglu A. (1999) In-vitro culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*Nov;14(11):2808-11.
- 26.** Elder K., Dale B. (2014) *İn-Vitro Fertilizasyon* (s. 50-56). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- 27.** Sadler TW Langman's. (2005) *Langman medikal embriyoloji* 9. baskıdan çeviri. Ed: Prof. Dr. Başaklar AC. Ankara, Palme Yayıncılık.
- 28.** Başaran N., Can C., Gürer F., Hassa H., Özaltık O., Soysal N. ve diğerleri. (2003). *İnfertil Olgularda Klinik Yaklaşım Ve IVF Laboratuvar Uygulamaları*. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Basımevi.

- 29.** Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M ve diğ. (2013) Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 99: s356-365.
- 30.** Desai N., Ploskonka S., Goodman L.R. (2014) Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Bio and endocrinology* 12:54.
- 31.** Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C ve diğ. (2013) The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet* 30: s703-710.
- 32.** Bavister BD. (1995) Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update*.Mar;1(2):91-148. Review.
- 33.** Kahraman S, Çetinkaya M (2013). Blastocyst Culture Using Time-lapse in Good Prognosis IVF Patients and Elective Single Embryo Transfer. *ClinicalTrials*.
- 34.** Gleicher N, Kushnir V A, Barad D H. (2015) Is it time for a paradigm shift in understanding embryo selection?. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13:3.
- 35.** Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba M J ve diğ. (2012) Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and Sterility* Vol. 98, No. 6: s 1458-1463.
- 36.** Van Royen E, Mangelschotsnk, De Neuborg D.(1999) Characterization of a top quality embryo, a step towards single embryo transfer. *Hum Rep*; 14: 2345-9.
- 37.** Tesarik J, Greco E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*. 14: s1318-1323.
- 38.** Payne D, Flaherty S P, Barry M F, Matthews C D (1997) Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction* vol.12 no.3 pp.532–541.

- 39.** Rossi-Ferragut L. M., Jr. Laconelli A., Aoki T., Rocha C.C., Santos D. R., Pasquolotto F.F., Jr. Borges E.(2003) Pronuclear and Morphological Features As a Cumulative Score to Select Embryos in ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) Cycles According to Sperm Origin. *Journal Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.20, No.1:1.
- 40.** Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. (1998) Early cleavage of human embryos to the two cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum reprod* ;13:182-7:183.
- 41.** Çiçek N, Mollamahmutoğlu L. (2009) A'dan Z'ye Yardımcı üreme teknikleri.Ankara: Palme yayıncılık.
- 42.** Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe K M, Ramsing N B and Remohı J (2011) The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction*, Vol.26, No.10: s2660.
- 43.** Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M (2012) Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive BioMedicine Online* 25: s 371– 381.
- 44.** Jr Verza S., Esteves C. S. (2008).Sperm Defect Severity Rather Than Sperm Source Is Associated With Lower Fertilization Rates after Intracytoplasmic Sperm Injection.*Clinical Urology* Vol.34(1): s50-55.
- 45.** Balaban B, Barut T, Urman B (2012) Assessment of Oocyte Quality. *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices* 13: s105-116.
- 46.** Kirkegaard K, Agerholm I E, Ingerslev H J (2012) Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human Reproduction*, Vol.27, No.5: s1277-1285.

- 47.** Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 73(6): s1155-1158.
- 48.** Tesarik J, Greco E. (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 14: s1318-1323.
- 49.** Işıklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B (2002) Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Med.* Jul;47(7):540-544.
- 50.** Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z. (2001) Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives. Martin Dunitz, United Kingdom.
- 51.** Vicdan K, Isık AZ. N (1999) İn vitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. *Çağdas Medikal Kitapevi.*
- 52.** Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. (2012) Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online*; 25: s474-80.
- 53.** Elder K., Dale B. (2014). İn-Vitro Fertilizasyon (s.165-167). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- 54.** Yalçınkaya E, Ergin E G, Çalışkan E, Öztel Z, Özay A, Özörnek H (2014) Reproducibility of a time-lapse embryo selection model based on morphokinetic data in a sequential culture media setting. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 15: s156-60.
- 55.** Loutradi K. E., Tarlatzis B. C., Goulis D. G., Zepiridis L., Pagou T., Chatzioannou E. (2006) The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.23 No.2:72,73.

- 56.** Chatziparasidou A, Oraiopoulou C, Moisidou M, Ioakeimidou C, Pappas C, Nijs M, Christoforidis N. (2014) Study of morphokinetic parameters in embryos originating from ejaculated or testicular spermatozoa. *Reprod Biomed Online*: PP-02.
- 57.** Minasi M G, Casciani V, Scarselli F, Terribile M, Franco G, Cotarello R P, Varrichio M T, Greco E. (2014) Morphokinetics of embryos obtained with normal ejaculated sperm or with testicular sperm from NOA patients. *ASRM Abstracts Vol. 102, No. 3, O-185, e64*.
- 58.** Loutradi K. E., Tarlatzis B. C., Goulis D. G., Zepiridis L., Pagou T., Chatzioannou E. (2006) The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol.23 No.2:72,73.
- 59.** Bukulmez O., Yucel A., Yarali H., Bildirici İ., Gurgan T. (2001) The origin of spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 94 250–255: 259.
- 60.** Ludwig M, Katalinic A.(2003) Pregnancy course and health of children born after ICSI depending on parameters of male factor infertility. *Hum Reprod. Feb;18(2):351-7:356*.
- 61.** Silber SJ (2010) Sperm retrieval for azoospermia and intracytoplasmic sperm injection success rates: a personal overview. *Hum Fertil (Camb)*. Dec;13(4): s247-256.
- 62.** Tesarik J., Mendoza C., Greco E. (2002). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction Vol.17, No.1:184,186*.
- 63.** Tsai CC, Huang FJ, Wang LJ, Lin YJ, Kung FT, Hsieh CH, Lan KC. (2011). Clinical outcomes and development of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using extracted testicular sperm or ejaculated extreme severe oligo-astheno-teratozoospermia sperm a comparative study. *Fertil Steril. Sep;96(3): s567*.
- 64.** Oron G, Fisch B, Sapir O, Wertheimer A, Garor R, Feldberg D, Pinkas H, Ben Haroush A (2014) Pregnancy outcome after ICSI with thawed testicular sperm from men with non-obstructive azoospermia compared to ICSI with ejaculated sperm from

men with severe oligoasthenoteratozoospermia and IVF with normal ejaculated sperm. *Gynecol Endocrinol.* Feb;30(2): s103-6.

65. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A (2012) Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and Sterility* Vol. 98, No. 6: s1481-1489.

66. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P. (1993) Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 8(7): s1055-1060.

67. Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, Nahum A, Golan A, Levran D. (2008) Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa. *Reproductive:*s 606-607.

68. Son WY, Chung JT, Henderson S, Reinblatt S, Buckett W, Chan PT, Holzer H. (2013) Fertilization and embryo development with spermatozoa obtained from testicular sperm extraction into oocytes generated from human chorionic gonadotropin-primed in vitro maturation cycles. *Fertil Steril* 100:989–93:993.

69. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Silber S. (1995) Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 10(6):s1457–60.

70. Qian Y, Feng T, Chen J, Cai LB, Liu JY, Mao YD, et al. (2005) Fertilization of in vitro matured human oocytes by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using ejaculated and testicular spermatozoa. *Asian J Androl* 7: s39–43.

