

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



**İNFERTİL OLGULARDA, YOĞUNLUK SIRALAYICISI (GRADYEN) VE PİCİSİ İLE
SEÇİLMİŞ SPERM'LER İLE ELDE EDİLEN EMBRİYO'LARIN FISH YÖNTEMİ İLE
GENETİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZMİ SELMAN KAL

DANIŞMAN

PROF. DR. TÜLAY İREZ

İSTANBUL
AGUSTOS 2017

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

Tez Savunma Tarihi : 20/09/2017

Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Gül BAKTIR
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Nurten DAYIOĞLU
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tezimin her safhasında etik dışı davranmadığımı, tez araştırmamı akademik yöntem ve kurallar çerçevesinde gerçekleştirdiğimi, bu çalışmamla elde edilemeyen bütün bilgilere, yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, akademik çalışmam esnasında telif haklarını ve patent ihlal edici bir davranış sergilemediğimi beyan ederim.

NAZMI SELMAN KAL

İTHAF

Sevgili Oğlum ALİM EMİR KAL'a ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimine başladığım andan itibaren ilgisini, bilgisini bir an olsun benden esirgemeyen ve akademik çalışma prensibini bana aşıl原因 değerli danışmanım Sayın **Prof. Dr. Tülay İREZ'e**, klinik başkanımız **Op. Dr. Halil İbrahim TEKİN'e**, koordinatörümüz **Emb. Ali KIZILKANAT'a**, bilgilerini benimle paylaşan, bana ışık olan değerli hocalarım **Op. Dr. Mehmet Can ASLANCA'ya**, **Op. Dr. Serap KAGAN'a**, **Yrd. Doç. Dr. Nurten DAYIOĞLU'na**, **Op. Dr. Levent ÖZGEN'e**, çalışma hayatımda bana her türlü desteği veren kurum direktörümüz **Mehmet Çetin ATAÜNAL'a**, **Mustafa KÖSE'ye**, bu kutsal mesleğe katılmama neden olan güzel insan **Özlem KESKİN'e** çok teşekkür ederim.

Dünyaya gözlerimi açtığım andan itibaren her daim sevgilerini ve maddi desteklerini esirgemeyen babam **Gıyasettin KAL'a**, annem **Güler KAL'a**, kayınvalidem **Kahlide ALİEVA'ya**, sevgili eşim **Leila ALİEVA'a**, ağabeyim **Ahmet KAL'a** canım aileme sonsuz kez teşekkür ederim.



Bu alışma **U.K.C.F.A TÜP BEBEK** tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iv
İTHAF	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR	xi
GRAFİKLER	xi
ŞEKİLLER	xi
RESİMLER	xii
EKLER	xiii
KISALTMALAR	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	18
1-GİRİŞ VE AMAÇ	20
2-GENEL BİLGİLER	21
2.1. İNSAN ÜREME HÜCRELERİ	21
2.1.1 Oosit Gelişimi	22
2.1.2 Testis Ve Spermatozoon Gelişimi	24
2.2. ÜREME HÜCRELERİNİN LABORATUVAR ORTAMINDA DEĞERLENDİRMESİ	29
2.2.1. Oositlerin Laboratuvar Ortamında Değerlendirilmesi	29
2.2.1.1. Kontrollü Ovaryen Hipersitülmasyon	30
2.2.1.2. Oosit Toplama (Oosit Pick Up-OPU)	30
2.2.2. Spermatozoonların Değerlendirilmesi	33
2.2.2.1. Semen Analizi	35
2.2.2.2. Yıkama ve doğrudan yüzdürme metodu	37
	viii

2.2.2.3. Yoğunluk sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi	37
2.2.2.4. Sperm konsantrasyonunun Makler® sayma kamarası ile ölçümü	37
2.2.2.5. Kruger Kriterlerine Dayalı Sperm Morfolojik (şekilsel) Değerlendirme	38
2.2.3.IVF (<i>in vitro</i> fertilizasyon) Yöntemi	39
2.2.4.ICSI (<i>intrastoplasmik sperm enjeksiyonu</i>) Yöntemi	39
2.2.5.PICSI Yöntemi	40
2.3.IN VİTRO ORTAMDA EMBRİYO GELİŞİMİ	42
2.3.1. Döllenme ve Pronükleus Skorlanması	42
2.3.2.Embriyo Bölünmesi ve Değerlendirmesi	43
2.3.3.Blastokist Değerlendirmesi	44
2.4.PGT (PREİMLANTASYON GENETİK TANI)	47
2.4.1.Kromozomlar	48
2.4.1.1.Kromozomların İşlevleri	48
2.4.1.2.Kromozom Morfolojisi	48
2.4.1.3.Kalıtsal Hastalıklar Genetiği	49
2.4.1.4.Kromozomal Anormallikler	50
2.5. GENETİK ANALİZ YÖNTEMLERİ	56
2.5.1. Kromozomal analiz yöntemleri	56
2.5.1.1.CGH (comparative genomic hybridization):	56
2.5.1.2.SNP (Single nuklotid polimorfizm):	56
2.5.1.3.FISH (fluorescent in situ hybriditation):	56
2.6. EMBRİYO BİYOPSİSİ	58
2.6.1. Kutup cisim-Polar Body Biyopsisi	58
2.6.2. Klivaj Biyopsisi	59
2.6.3. Blastokist Biyopsisi	60
3.GEREÇ VE YÖNTEM	61

3.1.GEREÇ	61
3.2. KONTROLLÜ OVARYUM HİPERSTİMÜLASYONU	62
3.3.OPU (OOCYTE PICK-UP)	64
3.4. OOSİT DENÜDASYON	65
3.5. KESİNTİLİ DANSİTE GRADYAN YÖNTEMİ (GRADIENT YÖNTEMİ)	67
3.6. GRADYEN İLE SEÇİLMİŞ SPERMLER İLE ICSI	70
3.7. PİCSI İLE SEÇİLMİŞ SPERMLER İLE ICSI	72
3.8. EMBRİYO GELİŞİMİ	74
3.8.1. Birinci Gün Embriyo Değerlendirme	75
3.8.2. İkinci Gün Embriyo Değerlendirme	76
3.8.3. Üçüncü Gün Embriyo Değerlendirme	76
3.8.4. Beşinci Gün Embriyo Değerlendirmesi	77
3.9. TROFEKTODERM BİYOPSİSİ	77
3.9.1. Trofektoderm Fiksasyonu	78
4-BULGULAR	79
5-TARTIŞMA	84
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	98
<i>Kişisel Bilgiler</i>	98
<i>Eğitim Düzeyi</i>	98
<i>İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sırala)</i>	98
EKLER	99

TABLolar

TABLO 1: Dünya sağlık örgütü 2010 semen kriterleri (**2010 WHO SEMEN KRİTERLERİ**)

TABLO 2: Çalışma grubu hastalarının oosit dağılımı ortalama durumları (m2 (metafaz 2), m1 (metafaz 1), gv (germial vezikül), dj (dejenere) oositlerdir.)

TABLO 3: Çalışma grubundaki hastaların eşinde elde edilen sperm örneklerinin bazal ve gradyen ile yıkama sonrası ortalama değerleri.

TABLO 4: Çalışma grubunda bulunan hastaların birinci gün fertilizasyon ve ikinci, üçüncü gün embriyo gelişimlerinin parametrelerinin yüzdelerik değerleri: ki-kare ve p değerleri.

GRAFİKLER

GRAFİK 1: Trofektoderm biyosisi sonrası FISH ile kromozomların genetik olarak incelenen hastaların normal kromozom ve anormal kromozom grafiği.

GRAFİK 2: FISH sonrası sağlıklı blastokistlerin transfer sonrası gebelik oranları karşılaştırmalı grafiği.

ŞEKİLLER

ŞEKİL 1: Spermatozoonların seminifer tüp epididimis ve üreme yolundaki gelişim evreleri. (**Keber R, Rozman D, Horvat S. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. J Lipid Res. 2013 Jan;54(1):20-33.**)

ŞEKİL 2: Spermatozoon çizimi; Memeli sperminin ultrastrüktürel yapısının çizim ile gösterilmesi (A) Memeli sperm flagellumu dört kısımdan yapılmıştır: Başa bağlanma kısmı, orta kısım, esas kısım ve son bölge. Orta kısım sonunda esas kısım başlar ve annulus ile ayrılır (B). Şematik enine kesitte orta kısımda plazma membranı (PM) ve mitokondriyal alan içinde (MS) şematik çizimde plazma membranı (PM) ve mitokondriyal bölge (MS) 9 çift mikrotubul bulunur, aksonem yapısını oluşturur. mikrotubuller arasında radyal bağlantılar dynein kollarını oluşturur (DA). Ayrıca merkezi çift mikrotubul yer alır. Esas kısımda fibröz proteinlerin oluşturduğu bir tabaka yer alır. Fibröz alan son kısımda görülmez. **(Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? J Androl. 2003 Nov-Dec;24(6):790-803.)**

RESİMLER

RESİM 1: Kontrollü Hipersitimülasyon'la geliştirilmiş follikül'lerin ultrason altındaki görüntüsü. **(U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)**

RESİM 2: 1-Germial Vezikül oosit 2- Metafaz I oosit 3- Metafaz II (Matür oosit) 4-Dejenere oosit **(U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)**

RESİM 3: 1-Makler kamarası görseli, 2-kontraks mikroskop altında makler kamarası görüntüsü **(U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır)**

RESİM 4: Mikromanipilatör resmi **(U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır TE300410709, Nikon®)**

RESİM 5: 1. PICSI petisi görüntüsü, 2. PICSI petisinin sperm hyanulunidaz bağlanma görüntüsü. **(ORIGIO®)**

RESİM 6: 1.tek pronukleus 2. iki pronukleus 3. çoklu pronukleus **(U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır)**

RESİM 7: 4 hücreli embriyo (U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır)

RESİM 8: 1- CM Kalite blastosist, 2- 1 Kalite blastosist, 3- 2 Kalite blastosist, 4- 3BC Kalite blastosist, 5-4AB Kalite blastosist, 6- 6CB Kalite blastosist (Hatcing blastosist) (U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır.)

RESİM 9: Kontrollü Hipersitimülasyon'la geliştirilmiş follikül'lerin ultrason altındaki görüntüsü. (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

RESİM 10: 1- Toplama Petrisi (Falcon® centre-well petrisi orta kısmına ve çevresinde ORİGİO® Flushing-yıkama mediumu 10 IU/ml heparin katkılı) 2- Fertilizasyon Petrisi (Nunc™ steril 60 mm petri içerisine Sage® one step medium'la 500 mikrolitre 2 adet damla ve 40 mikrolitre 4 adet) (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

RESİM 11: Nunc™ 60mm petri içerisine ORİGİO® Flushing medium 10IU/ml heparin katkılı 300 mikrolitre büyük bir damla yapıldı bu damla'nın içerisine 100 mikrolitre Lifeglobal® hyaluronidase çevresine 40 mikrolitre olacak şekilde 4 adet yıkama ve fiziksel denüstasyon damlacıkları. (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

RESİM 12: Falcon® konik tabanlı tüp içerisinde 0,5 ml ejakülat, 0,5 ml %45 gradyen, %90 gradyen (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

RESİM 13: ICSI petrisi (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

RESİM 14: PICSI petrisi (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

EKLER

EK 1: Data kullanma onay belgesi

KISALTMALAR

IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
PCO	: Polikistik Over Sendromu
FISH	: Flüoresans in situ hibridizasyon
OPU	: Oosit Çıkarma
$\mu\pm\sigma$: İstatistik varyans
M2	: Metafaz 2 oosit
M1	: Metafaz 1 oosit
PN	: Pronükleus
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DFI	: DNA fragmentasyon indeksi
LH	: Luteal Hormon
FSH	: Folikül Stimulasyon Hormon
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
KOH	: Kontrollü Overyal Hipersitimulasyon
μm	: Mikrometre
HTF	: İnsan Tübal Sıvısı
NPB	: Çekirdek Öncüsü
ZP	: Zona Pellisuda
CGH	: Karşılaştırmalı Genomik Hibritizasyon
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi

PGT : Preimplantasyon Genetik Tanı

μ l : Mikrolitre

IU/ml : İnternasyonel Ünite / Mililitre

v/v : Hız / Hız

dk : Dakika

ml : Mililitre

Ref : Referans

HA : Hyalürinik Asit

ÖZET

Kal N.S. İNFERTİL OLGULARDA, YOĞUNLUK SIRALAYICISI (GRADYEN) VE PİCSİ İLE SEÇİLMİŞ SPERMLER İLE ELDE EDİLEN

EMBRİYOLARIN FISH YÖNTEMİ İLE GENETİK ANALİZİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2017.

Amaç: Bu çalışmada önceki uygulamalarında kromozom anormalliği olan ve IVF sonuçları başarısız olan genç hastalarda yoğunluk gradiyent ile veya PICSI ile seçilmiş spermier kullanarak elde edilen embriyolarda aneuploidi oranlarının karşılaştırılması amaçlandı.

Materyal ve metod: Bu çalışma U.K.C.F.A. IVF merkezinde uygulaması yapılan, önceki uygulamalarında kromozom anormalliği saptanan 27 hastanın embriyo biopsisi sonucu elde edilen verilerin analizi ile yapılmıştır. Bu çalışmaya PCO, endometriosis ve ileri kadın yaşı faktörlü hastalar ve akraba evliliği dahil edilmemiştir. 27 hasta üzerinde yapılan bu çalışmada toplam 471 oosit kullanılmıştır. Bunlardan 236 adet oosit gradyen metodu ile seçilmiş spermierle döllenmiş, 235 adet oosit ise PICSI yöntemiyle seçilen spermierle döllenmiştir. Çalışmada 223 blastokist gelişmiş ve bunlardan 97'si gradyen yöntemi ile elde edilen spermierle ICSI yapılmış 129'una PICSI yöntemi ile elde edilen spermier kullanarak ICSI yapılmıştır. Elde edilen blastokistlere trofektoderm biopsisi yapılmış ve FISH yöntemi ile 13, 18, 21, X ve Y kromozomları incelenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için student's t-testi, Chi-Square, Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular: Kadınlardan OPU (oosit pick-up) yöntemi ile toplanan oositlerin (471) ortalama değerleri $21,8 \pm 5,0$ ($\mu \pm \sigma$)'dir. Denüstasyon (ayıklama) işlemi sonrası elde edilen M2 (metafaz II) matür oosit ortalama değeri $17,4 \pm 3,9$ ($\mu \pm \sigma$)'dür. Ortalama sperm konsantrasyonu $54,1$ (milyon) ml/sayı $\pm 32,4$ ($\mu \pm \sigma$), total motilite $50,4\% \pm 12,4$ ($\mu \pm \sigma$)'dür. Gradyen yöntemiyle elde edilen spermierin ortalama konsantrasyonu $21,9$ ml/sayı (milyon) $\pm 11,2$ ($\mu \pm \sigma$), total

motilite $77,6(\%) \pm 9,3(\mu \pm \sigma)$ 'dür. PICSI yöntemiyle seçilen spermiler ile yapılan ICSI'nin, gradyen yöntemiyle seçilmiş spermilere göre gelişen embriyolarda 2PN (pronükleus) oranları anlamlı farklı görülmüştür. ($p=0,003$) Embriyo gelişim takibinde ikinci gün embriyo hücre sayısı ≥ 4 , blastomerde tek çekirdek varlığı, embriyo fragmentasyonu ve blastomer parlaklığı incelenmiş ve anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p=0,346$, $p=0,100$, $p=0,717$, $p=0,297$) . Üçüncü gün embriyolarında her iki grup karşılaştırıldığında hücre sayısı ≥ 8 olduğu durumda, blastomerde tek çekirdek varlığı, fragmentasyon ve blastomer parlaklığı değerlerinin istatistiki anlamlılığı bulunmamıştır. ($p=0,383$, $p=0,341$, $p=0,487$, $p=0,932$). Embriyolardan blastokist gelişimi gösterenlere yapılan trofektoderm biyopsisi sonrası FISH yöntemiyle 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarında anöploidi oranları incelenmiş, Gradyen veya PICSI ile seçilen spermilerle yapılan ICSI işlemi ile elde edilen blastokistlerin kromozom anomalisi açısından her iki grubun farklı olmadığı görülmüştür($p=0,065$). 27 hastaya yapılan sağlıklı embriyo transferinde gebelik oranları gradyen yöntemiyle seçilen spermilerle elde edilen veya PICSI işlemiyle seçilen spermilerle elde edilen embriyo transferi işlemi ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,075$).

Tartışma: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar PICSI ile ve gradyen yöntemi ile seçilen spermiler ile elde edilen embriyoların aneuploidy oranlarının ve gebelik oranlarının benzer olduğunu göstermiştir. Çalışmanın elde edilen sonucuna bağlı olarak PICSI yönteminin yararının tartışmalı olabileceği kanısına varılmıştır. Çalışmanın bu nedenle geniş hasta gruplarında tekrarlanması uygun bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: PICSI, Gradyen, kromozom, FISH, ICSI

ABSTRACT

Kal N.S, The chromosomal evaluation of Embryos using the FISH method where embryos obtained are produced with the use of ICSI and sperm are selected on basis of gradient and PICSI and the evaluation of its overall effects on infertility. Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Health Sciences Institute, Clinical Embryology Program, Masters Thesis. Istanbul, 2017.

Purpose: In this study, it was aimed to compare the aneuploidy rates of embryos obtained with density gradients or PICSI-selected sperm in young patients with chromosome abnormality related to Y chromosome in the past.

Material and Methods: This work was carried out by U.K.C.F.A. IVF center, embryo biopsy of 27 patients diagnosed with Y chromosome abnormality in family history was performed by analysis of the results obtained. PCO, endometriosis and advanced female age-related patients and relatives marriage were not included in this study. A total of 471 oocytes were used in this study on 27 patients. Of these, 236 oocytes were fertilized with selected sperm by gradient method and 235 oocytes were fertilized with sperm selected by PICSI method. In the study, 223 blastocysts were developed and ICSI was performed using sperm obtained by PICSI method for 129 and gradient selection for 97 embryos. Obtained blastocysts were biopsied with trophoectoderm and 13, 18, 21, X and Y chromosomes were examined by FISH method. Student's t-test, Chi-Square, Kruskal Wallis test and Mann Whitney U test were used to evaluate the results.

Results: The mean value of oocytes collected from women by OPU (oocyte pick-up) method is 21.8 ± 5.0 ($\mu \pm \sigma$). The mean value of the M2 (metaphase II) mature oocyte obtained after the experiment (extraction) is 17.4 ± 3.9 ($\mu \pm \sigma$). The mean sperm concentration is 54.1 (million) ml / number ± 32.4 ($\mu \pm$

σ), total motility is 50.4 ± 12.4 ($\mu \pm \sigma$). The average concentration of the spermatozoa obtained by the gradient method 21.9 ml / number (in millions) ± 11.2 ($\mu \pm \sigma$), total motility 77.6 (%) ± 9.3 ($\mu \pm \sigma$), respectively. PICSI is made with the selected sperm in the ICSI method, gradient method with the selected sperm in the developing embryo by 2PN (pronuclei) had significantly different rates. ($P = 0,003$) were examined in the second day of embryo development and the embryo cell number ≥ 4 . There was no statistically significance ($p = 0,346$, $p = 0,100$, $p = 717$, $p = 0,297$). in the blastomer nucleus, fragmentation and blastomer brightness values on the third day when the number of cells ≥ 8 . There was no statistically significance ($p = 0,383$, $p = 0,341$, $p = 0,487$, $p = 0,932$) After that trophoectoderm biopsy to show the development of the blastocyst from embryos FISH method with 13, 18, 21, examined aneuploidy in the X and Y chromosomes, gradient or PICSI and were found not to be different as chromosomal the blastocyst obtained made icsi'yl with the selected sperm ($p = 0,065$). 27 patients were seen made healthy embryos Transfer Man in pregnancy rates gradient with the selected PICS sperm with made ICSI treatment methods a significant statistical difference compared to ICSI transactions with the selected sperm ($p = 0.075$).

Discussion: The results of this study showed that the aneuploidy and pregnancy rates of embryos obtained with PICSI and gradient method sperm were similar. It has come to the conclusion that the benefit of the PICSI method may be controversial, depending on the outcome of the work. For this reason, it was found appropriate to repeat the study in large study groups.

Key words: PICSI, Gradient, Chromosome, FISH, ICSI.

1-GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite tedavisinde son yıllarda büyük gelişmeler olmuştur. Bu gelişmelerin en başında ileri düzeyde erkek faktörlü inferitlite olgularında uygulanan laboratuvar yöntemleridir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yönteminin keşfinden sonra ileri erkek infertilite sorunlarında büyük bir başarı sağlanmış oldu⁽¹⁾. Bununla beraber tıbbi genetik alanında meydana gelen gelişmeler seks kromozomlarına bağlı genetik hastalığı bulunan çiftlerin sağlıklı bebek sahibi olmasına yönelik olarak ileri analiz yöntemleri ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemlerden Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi belirli sayıda kromozomun anöploidi durumlarını incelemeye başarılı bir yöntem olarak bilinmektedir⁽²⁾.

Klasik ICSI yöntemiyle sperm morfolojik ve motilite yönünden incelenebilmekte ve uygulama yapılmaktadır. Ancak sperm morfolojik yönden uygun olması kesin olarak matür olduklarını göstermediği bilinmektedir⁽²⁾. Matürasyonunu tamamlayan sperm DNA hasarı varlığı az olmakta ve bu kalitede spermle yapılan ICSI işlemi sonrası döllenme, embriyo gelişimi ve blastokiste gidişi çok daha başarılı olduğu bilinmektedir.⁽³⁾ Spermde DNA kırığı oranının normalden fazla olması fertilizasyon oranlarının düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca embriyo gelişimi anlamlı derecede bozulmakta, DNA hasarındaki artışlar gebelik şansı azalmakta veya düşük oranlarını artırmaktadır (4). İnfertil erkeklerde DNA hasarının normal erkeklere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir⁽⁴⁾. Sperm analizinde normal morfoloji, hareketlilik ve sperm sayısında anormallik saptanan sperm DNA hasar oranı da yüksektir (4). Sperm DNA kırıklarının (DFI: DNA fragmentasyon indeksi) saptanmasında değişik genetik testler uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalar sağlıklı bir gebelik bekleniyorsa hasarlı DNA içermeyen sperm sayısının yani DFI'nin %30'un üzerinde olması gerektiğini göstermektedir⁽⁴⁾.

PICSI yöntemiyle sperm seçimi yönteminin matürasyonunu tam olarak tamamlamış spermlerin kullanılmasına olanak sağladığına inanılmaktadır(5). Spermlerin akrozom bölgesinde bulunan reseptörler, oositlerin kümülüs oosforus da bulunan bağlanma reseptörlerine bağlanırlar(5). Bu bağlanmayı sağlayan spermlerin olgun, yüksek DNA bütünlüğüne, doğal kromozomal anöploidi frekansa sahip ve doğal dölleme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir(5). PICSI petrisinin belirli bölgelerinde hyalüronik asit bulunmakta ve bu bölgelere bağlanan spermlerin matür olduğu düşünülmektedir.

FISH genetik analiz yöntemiyle belirli sayıdaki kromozomlar anöploidi yönünden incelenebilmektedir. Bu çalışma İnfertil olgularda, yoğunluk sıralayıcı (gradyen) ve PICSI ile seçilmiş spermler ile elde edilen embriyoların anöploidi yönünden incelemesi amaçlamış bir çalışmadır.

Yüksek lisans tezimin kaynak taramasında infertil olgularda, yoğunluk sıralayıcısı (gradyen) ve PICSI ile seçilmiş spermler ile elde edilen embriyoların FISH (floresan in situ hibridizasyon) yöntemi ile genetik analiz ile ilgili karşılaştırmalı herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada infertil olgularda, yoğunluk sıralayıcısı (gradyen) ve PICSI ile seçilmiş spermler ile elde edilen embriyoların FISH (floresan in situ hibridizasyon) yöntemi ile genetik analizinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. İNSAN ÜREME HÜCRELERİ

İnsanlar da üreme sisteminin oluşumu X ve Y kromozomlarının varlığıyla belirlenir ve bu kromozomlar cinsiyet tayinini sağlar.

Primordial gonadal kabartılar alt torasik ve üst lumbar bölgelerin posterior duvarında gelişir ve her iki cinste de farklılaşmamış mezenşimal

doku testis ve ovaryumların esasını oluşturur. Gebeliğin yaklaşık 6. haftasında, gelişmekte olan gonadlar erkek ve dişi embriyolarda birbirine benzer ve 7-10 gün boyunca seksüel olarak farklılaşmamış olarak kalır. Bu periyotta, genital kabartıyı çevreleyen prizmatik kölom (germinal) epitel hücreleri gonadları oluşturmak üzere kolonlar haline bu farklılaşmamış dokuya yayılır ve primitif seks kordonu olarak adlandırılırlar. Böylece gonadlarda anahtar rol oynayan morfolojik değişiklikler meydana gelmeye başlar ve bu değişikliklerin oluşmasında Y kromozomunda bulunan seks belirleyici bölge (SRY) geninin bulunup bulunmamasına bağlıdır. Bu morfolojik değişiklikler aşağıdaki yapıların oluşmasıyla sonuçlanır⁽⁶⁾.

Genital kanallar

Wolff kanalı = erkekte şekillenir; vaz deferens ve epididimisin öncüsüdür.

Müller kanalı = dişide şekillenir; tuba uterinalar, vajinanın üst bölümü ve uterusun öncüsüdür.

X ve Y üzerindeki genlerin varlığın cinsiyetin belirlenmesine ve bunların gelişimi üzerine etkilidir. Bununla beraber hormonların da gelişim üzerine etkisi mevcuttur⁽⁷⁾.

2.1.1 Oosit Gelişimi

Dişilerde oosit gelişimi embriyonik dönemde başlar. Dişi embriyolarda, iki X kromozomu içeren primordial germ hücreleri genital kabartılardan primordial gonada göç ederek oogonia adını alırlar. Primordial germ hücreleri gonadal kabartıya ulaştığında (yaklaşık 20-30. günlerde) oogoniumlar sınırlı bir süre mitoz ile bölünerek çoğalırlar. Mezonefrozdaki hücreler ovaryan medüllayı oluşturmak üzere yayılırlar ve germ hücrelerini de kortekse doğru iterler. Erkek embriyolarda spermatogoniumlar pubertenin başlamasına kadar mayoz bölünmeye girmezlerken dişi embriyolardan

gebeliğin yaklaşık 12. haftasında, (ilk trimesterin sonunda) oogoniumlarda ilk mayoz bölünme gerçekleşir. İnsanda, 8. haftada 600.000 civarında olan oogonium popülasyonu 16-20. haftalarda 6-8 milyona kadar çıkar. Bu evrede artık oogoniumlar primer oosit olarak bilinir ve mitoz ile bölünerek çoğalmazlar. Folikül içine girmeyen oositler dejenere olur ve doğumda, overlerin içerdiği oosit sayısı 1-2 milyon kadardır. Bu dönemde artık ovaryumların yapısı oosit ve oositle ilgili hücrelerle tamamen oluşturulmuştur⁽⁸⁾.

Oogoniumlar 1. mayozdan sonra, profaz I'in diploten evresinde kalırlar. Kromatid değiş-tokuşu (kromatid Exchange) ve diakinezis (crossing over) gerçekleştirdikten sonra ise profaz I'in geç evresine geçerler. Oositler pubertede ovulatuvar siklusların başlamasına kadar bu evrede kalırlar: mayozun yeniden başlamasını sağlayan gelişim evreleri puberteden sonra antral follikülünün seçimine kadar tamamlanmaz⁽⁸⁾.

Primordial folliküller duraksama evresinde, gelişmeye başlamak için sinyal bekleyerek 50 yıl kadar kalabilirler. Puberteden sonra, bir miktar primordial follikül her gün seçilerek büyümeye başlar ve üç evreyi kapsayan gelişme sürecine girerler: primer veya preantral, sekonder veya antral follikül oluşur⁽⁸⁾.

XX kromozoma sahip embriyo ilk evrelerinde ovaryum gelişim başlar. Gelişen ovaryumda germ hücreleri bu bölgede mitozla çoğalırlar ve belirli sayıya gelen hücreler mayoz I'e girerler ve duraksarlar. Bu duraksama ergenlik evresine kadar devam eder. Böylece belirli sayıda oosit sabit bir rezerv oluşturur. Oositlerin FSH etkisiyle follikül gelişimi başlarlar. Gelişen oositlerin teka interna hücrelerinde östrojen salgısını artırır ve kanda belirli bir düzeye kadar yükselmesi FSH üzerine negatif feedback etkisi oluşturur, aynı anda LH üzerine pozitif feedback etki oluşturur. LH seviyesi yükselmesi ile gelişen graaf follikül içerisindeki oosit mayoz II'nin metafaz II evresine girer

ve duraksar. LH değerinin en yüksek olduğu noktada ovaryumda ovulasyon şekillenir ve oosit atılır. Atılan oosit tuba uterinanın infundibulum denen yapısının yardımıyla tuba uterinanın içine alınır. Dişı üreme kanalına girmiş olur. Üreme kanalındaki oosit kanal içinde bulunan mikrovilluslar yardımıyla kanal içerisinde ilerler. Eğer kanal içerisinde tuba uterina'nın ampulla bölgesinde fertilizasyon gerçekleşirse oosit yarıda kalan mayoz II'yi tamamlar(9,10). Şayet fertilizasyon gerçekleşmez ise endometriumdan salgılanan prostaglandin F2 alfa etkisiyle korpus luteumdan salgılanan progesteronu (prostaglandin f2 alfa ovaryum beslenmesini sağlayan damarlar üzerine baskı etkisi sağlayarak korpus luteum etkisini ortadan kaldırır) engeller. Kalınlaşan endometrium oositler beraber vajinadan atılır. Böylece FSH(progesteron FSH'ı baskı altında tutar) etkisi tekrar artmaya başlar. Şayet fertilizasyon gerçekleşir ve endometriyuma tutunursa progesteron miktarı artar gebeliğin ilerleyen evrelerinde progesteron korpus luteumdan endometriyuma devreder⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

2.1.2 Testis Ve Spermatozoon Gelişimi

Erkeklerde testis gelişimi embriyogenik dönemde başlar. Embriyogenik dönemde primordial germ hücrelerinin mezonefroz da genital kabartıyı oluşturmak üzere toplanmasından sonra; kölom epiteli erkekte dışidekinden daha hızlı çoğalır ve medüller mezenşimin derinlerine doğru nüfuz ederek testis kordonlarını oluşturur(10). Böylece iki farklı testiküler bölmesi şekillenir: Testiküler kordonlar ve interstisyel bölge SRY gen ekspresyonu sertoli hücrelerinin farklanmasını başlatır ve gelişen sertoli hücreleri de testiküler kordonların şekillenmesi için gerekli olan büyüme faktörünü, fibroblast büyüme faktörü 9'ü (FHF-9) salgılar⁽¹⁰⁾.

Fötal yaşamın 16-20. haftalarında sertoli hücreleri ve sakin olan prospermatogoniumlar seminifer kordonların bazal membranı üzerine

bulunur. Testisler puberteye kadar büyümeye devam eder ve pubertenin başlamasıyla birlikte boyutları hızla artar⁽¹⁰⁾.

Leydig hücrelerinin endokrin sekresyonunun başlamasıyla birlikte intratübüler sertoli hücrelerinin boyutları büyür ve aktiviteleri önemli ölçüde artar. Kordonlardaki prospermatogonium hücreleri artık seminifer tübülleri döşeyen spermatogenetik hücreler olarak tanımlanır ve bu hücreler mitoz ile bölünmeye başlarlar⁽¹⁰⁾.

Gelişimin devamında testislerin skrotum içine inmesi gerekmektedir. Önceleri embriyonun üst lumbar bölgesinde gelişen testisler, fetal yaşam sırasında abdominal boşluk boyunca pelvis kenarına doğru hareket ederler. Testislerin aşağı doğru hareketinde leydig hücrelerinin salgılandığı hormonlar etkilidir ve iki ligament de bu işleve katılır: Bu ligamentler testisin üst kutbundaki süspensör ligament ve alt kutbundaki gubernakulum ligamenttir. Fötüsün boyu uzadıkça süspensör ligament değişmez, ligamentlerin testislerin hareketine bu şekildeki mekanik katılımıyla testisler pelvise yerleşir⁽¹¹⁾. Gebeliğin 25-28. haftalarında testisler inguinal kanal boyunca pubik kemiğin üzerinden hareket ederek 35-40. haftalarında skrotuma ulaşırlar. Testislerin vücut boşluğunun dışındaki pozisyonundan dolayı ısıları vücut ısısından yaklaşık 2°C daha düşüktür ve bu değer spermatogenezis için optimaldir⁽¹¹⁾.

Gelişimini tamamlamış testisler yaklaşık 200 mm. uzunluğunda seminifer tübül içerirler ve testis volümünün büyük bir kısmını oluşturan bu tübüller spermatogenezisin gerçekleştiği yapılardır. Spermatogenezis başlaması puberteyle başlar⁽¹¹⁾.

Spermatogenezis süreci, her biri özel germ hücrelere tipiyle bağlantılı olmak üzere üç evrede incelenebilir:

1. *Proliferasyon (spermatositogenezis): Spermatogonia*

2. *Redüksiyon (indirgenme) bölünmesi (mayoz): Spermatisitler*

3. *Farklılaşma (spermiogenezis): Spermatisidler*

Puberteden sonra seminifer tübüllerin germinal epitelindeki kaynak hücreleri (tip A spermatogonium) aralıklarla DNA'larını ikiye katlayarak mitoz ile bölünürler. Her bir mitoz bölünme iki kardeş hücreyi oluşturur: Bu iki kardeş hücrelerden biri tip A spermatogonium diğeri ikinci tip hücre olan tip B spermatogoniumlardır. İkinci grup hücre lümene daha yakın olan bölümlere hareket eder ve mayoz bölünme geçirerek farklılaşmaya başlar⁽¹²⁾.

Lümene yakın olan bölümdeki, hücreler iki mayoz bölünme geçirerek önce kardeş sekonder spermatisitleri meydana getirir ve sonuçta dört tane erken spermatisid oluşur. Bir seri farklılaşma evrelerinden geçilerek mayoz bölünme (redüksiyon bölünmesi) ile 46 kromozumlu diploid kaynak hücreden (spermatogonium) 23 kromozom içeren haploid gametler meydana gelir. Birinci mayoz sonucunda tip B spermatogoniumlar ($2n:2c$) primer spermatisitleri ($1n:2c$) oluştururlar. Bu hücreler de tekrar bölünerek sekonder spermatisitleri ($1n:1c$) meydana getirirler. Sekonder spermatisitler bu evreyi hemen geçerek ikinci mayoz bölünmeyi tamamlarlar ve oluşan yeni hücreler spermatisid olarak isimlendirilir. Bu hücreler artık spermatozoonları ($1n:1c$) meydana getirmek üzere matürasyon sürecinden (spermiogenezis) geçerler⁽¹²⁾. (Şekil 1)

Spermatisidler farklılaşması dört evrede gerçekleşir:

1. *Golgi evresi*

2. *Kep evresi*

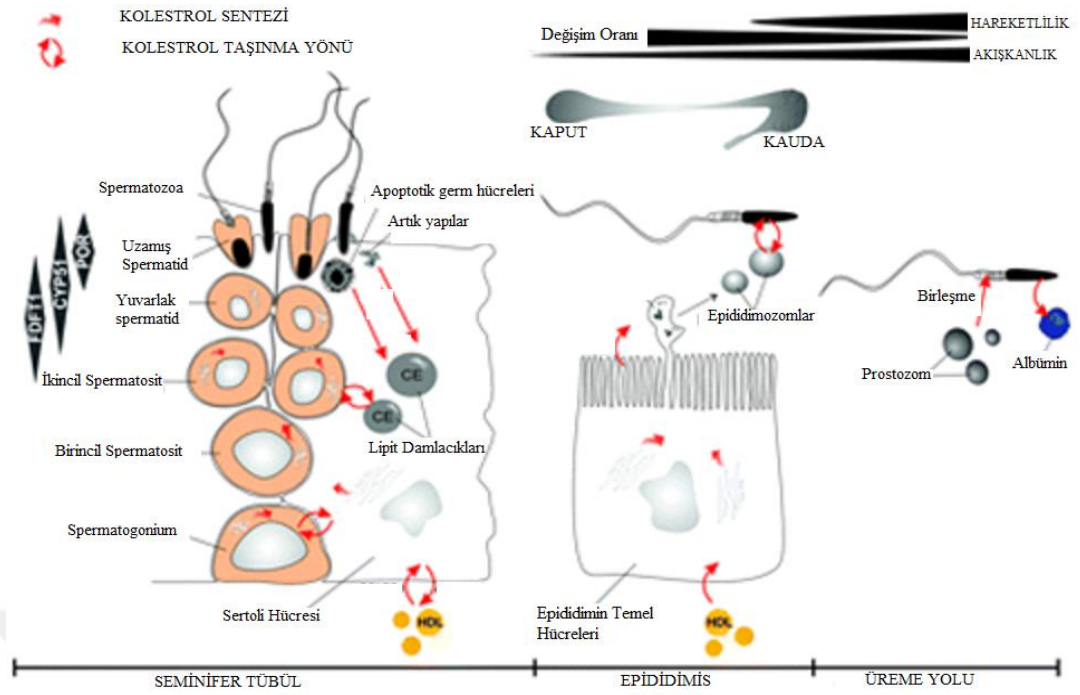
3. *Akrozom evresi*

4. *Matürasyon evresi*

Spermatid çekirdeği haploid kromozom seti içerir. Terminal farklılaşmanın uzun bir evresi olan spermiogenezise girildiğinde, otozomlar az miktarda rRNA, mRNA ve protein sentezlenemeye devam ederler. Bu evrede yuvarlak spermatidler yoğunlaşmış bir çekirdek ve kuyruğu olan, uzun spermatidlere dönüşürler. Bu hücreler mitoz veya mayoz ile tekrar bölünmezler, ancak dişi genital kanallarından geçerek oositi fertilize edebilme fonksiyonunu kazanabilmeleri için değişikliği uğramaları gerekir⁽¹²⁾. Bu farklılaşma süreci birçok türde 2 hafta kadar devam eder ve belirgin evreleri vardır:

- 1. Spermatid DNA'sı hayli yoğunlaşmış olur ve somatik histonların yerini proteinler alır.*
- 2. Oosite penetrasyon için gerekli enzimleri içeren bir kese olan akrozom, golgi membranlarından gelişir.*
- 3. Sitoplazmik yeniden düzenlemeyle mitokondriyum ve motilite ile ilgili kontrol mekanizmalarını içeren parça (mid piece) şekillenir.*
- 4. Hücrenin hareketliliği sağlayan flagellum (kuyruk) oluşur.*
- 5. Sitoplazmanın fazlası sertoli hücrelerince absorbe edilir.*

Sperm morfolojik değişimi muhtemelen sertoli hücreleri tarafından düzenlenir ve spermatogenezis ilerledikçe hücreler tübül lümenine doğru hareket eder. Spermatogenezis boyunca hücrelerin gelişme hızı bellidir ve hormonlar gibi dış faktörlerden etkilenmezler. Depolanan mRNA translasyonunun zamanlanması en önemli kontrol noktasıdır: örneğin, protamin 1 geni spermatidlerde kopyalanır ve sonuçta oluşan mRNA'ların sadece birkaç saat veya birkaç gün depolanması ise zamanlanmanın iyi belirlendiği, geçici bir geçiş kontrol programının varlığını gösterir⁽¹³⁾.



Şekil 1: Spermatozoonların seminifer tüp epididimis ve üreme yolundaki gelişim evreleri. (Keber R, Rozman D, Horvat S. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. J Lipid Res. 2013 Jan;54(1):20-33.)

Memeli spermleri testisten ayrıldıklarında henüz oositi fertilize edebilecek kapasitede değildir. Bu özelliği, epididimis boyunca ilerlerken kazanır ve spermlerin geçirdiği bu sürece epididimal matürasyon adı verilir. Epididimis üç bölüme ayrılır: Üst 1/3 kısmı oluşturan kaput epididimis silli yalancı çok katlı epitelle döşelidir ve duktuli efferentesler şekillendirir. Vas eferens tübülleri birleşerek korpus epididimisin tek bir kıvrıntılı tübülünü oluşturur ve bu bölgede epitel sil içermez, kauda epididimise doğru müsküler tabaka oluşur, tübül lümeni daha genişir ve ejakülasyondan önce spermler bu bölgede depolanır⁽¹⁴⁾.

Spermler epididimisin farklı bölgelerinden geçerken, sperm başının zona pellusida ile ilişki kurabilecek özelliklerin kazanabilmesi için negatif yüklenmenin artması gerekir. Oosite bağlanma ve birleşme gerçekleşmesinde işlevsel olduğu gösterilen antijenlerin birçoğu, testiste sentezlenir. Bu antijenler epididimisin belli bir bölgesinde, biyokimyasal

modifikasyonla veya hücrel lokalizasyonlarını değiştirerek veya her iki yolu birden kullanarak aktive olurlar⁽¹⁴⁾.

Kuyruk aktivesi için gerekli olan tüm morfolojik değişiklikler spermiogenezis sırasında geręekleřmesine karşın; testiküler spermler yıkandıktan sonra fizyolojik solüsyon içine alınsa bile, esas olarak immotildir. Spermler kaput epididimiden geçerken hareket etmeye başlar ve kauda epididimise ulaştıklarında ileri hızda hareket yeteneği kazanırlar. Matürasyon sırasında, spermler endojen metabolik rezervlerini tükettiklerinden fruktoz gibi eksojen kaynaklara gereksinim duyarlar ve bu sırada sitoplazmik droplet atılır⁽¹⁵⁾.

Özetle testislerde gelişimi başlayan spermler en son matürasyonlarını epididimiste tamamlarlar böylece döllenme yeteneği kazanırlar. En son olarak prostata ve glandüla vesikülosadan gelen sıvılarla ejakülat olarak ejakülasyonla atılırlar.

2.2. ÜREME HÜCRELERİNİN LABORATUVAR ORTAMINDA DEğERLENDİRMESİ

Dişi ve erkek gamet hücreleri farklı yapı ve özelliklere sahiptir. Sperm ve oositlerin laboratuvar ortamında değerlendirilmesi konusunda farklılıklar vardır.

2.2.1. Oositlerin Laboratuvar Ortamında Değerlendirilmesi

İn vitro ortamlarda oositlerin değerlendirilmesi için öncelikle oositlerin invazif yöntemlerle ovaryumlardan (oosit toplama) alınması gerekmektedir. Ancak normal siklus üzerinde bu yöntemle çok az sayıda oosit elde edilmektedir. Öncelikle ovaryumdaki folliküller hormonlar yardımıyla tetiklenir ve çok sayıda oosit gelişimi sağlanır bu işleme kontrollü overyan hipersitimülasyon denir. Böylece çok sayıda oosit invazif yöntemle toplanır ve laboratuvar ortamında değerlendirmeye alınır.

Laboratuvar ortamında doğrudan oositlerin değerlendirilmesi yapılamaz. Çünkü oositlerin çevresinde bulunan kümülüs hücreleri oositlerin tam olarak görünmesini engeller. Bunun için öncelikle oositlerin bu hücrelerden temizlenmesi gerekmektedir. Bu işleme oosit ayıklanması (denüstasyon) denir.

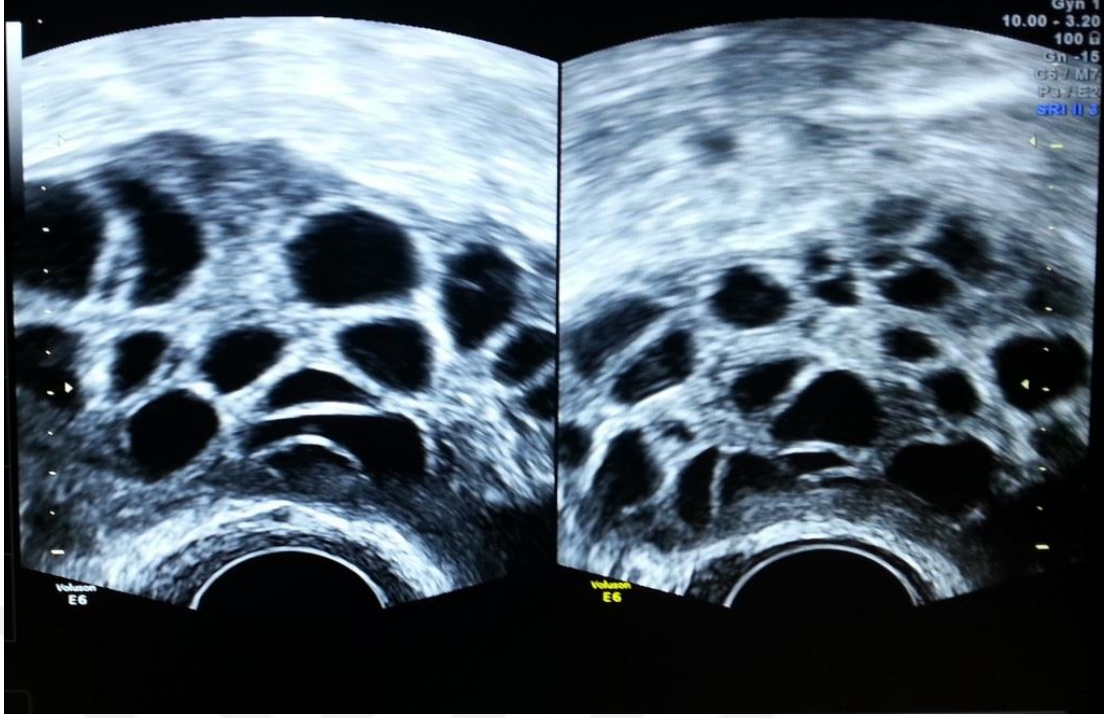
Temizlenen oositler artık değerlendirmeye hazırdır invert mikroskop altında oositler morfolojik yönden değerlendirilir.

2.2.1.1. Kontrollü Ovaryen Hipersitüstasyon

Ovaryen stimüstasyon sadece adet kanamasının olmaması (amenore) ve yumurtlamanın hiç olmaması (anovüstasyon) durumlarında değil tubal, erkek faktörlü ya da nedeni bilinmeyen infertilite olgularında da kullanılmaktadır. KOH (Kontrollü Ovaryen Hipersitüstasyon) konsepti IVF pratiğinden doğmuştur. Uterusa birden fazla embriyo verilerek gebelik hızının arttığına anlaşılmamasıyla, iyi kalitede yumurtaların seçilebilmesine imkân verecek ve mümkün olduğunca çok follikülün elde edilebileceği KOH protokolleri önem kazanmıştır. KOH protokollerinde amaç öncü folliküllerin eşik noktasını azaltarak dominant follikül seçim işlemini bertaraf etmektir⁽¹⁶⁾.

2.2.1.2. Oosit Toplama (Oosit Pick Up-OPU)

Kontrollü ovaryen hiperstimüstasyonla birden fazla oosit gelişimi sağlanmasından sonra oosit toplam işlemi yapılır. Buda folliküllerin OPU iğnesi yardımıyla genel anestezi altına ultrason rehberliğinde vajinal prob kullanılarak yapılan invazif bir yöntemdir.(Resim 1)



Resim 1: Kontrollü Hipersitimülasyonla geliştirilmiş follüküllerin ultrason altındaki görüntüsü. (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

Bu yöntemde hasta önce genel anestezi altına alınır. Anestezi altındaki hasta vajinal prob yardımıyla overleri kontrol edilir ve gelişen follüküller gözlemlenir. OPU iğnesi ile vajinanın yan duvarından ultrason rehberliğinde girilir ve ovaryumlarda oluşan follüküller iğne yardımıyla içleri boşaltılır. Boşalan follüküller tüplere aktarılır ve aynı anda embriyoloji laboratuvarına getirilir. Burada mikroskop altında incelenerek oositler kümülüs hücreli bir şekilde toplanır⁽¹⁷⁾.

Gelişim gözlenen yeteri boyuttaki tüm follükülerin toplama işlemi tamamlandıktan sonra hasta genel anesteziden çıkarılır ve iki saat dinlenme ile kontrol altında tutulur.

OPU işlemi ile elde edilen oositler belirli bekleme süresi sonrasında kimyasal ve fiziksel oosit ayıklama (denüstasyon) işlemi yapılır ve oositler değerlendirmeye hazır hale gelirler⁽¹⁸⁾.

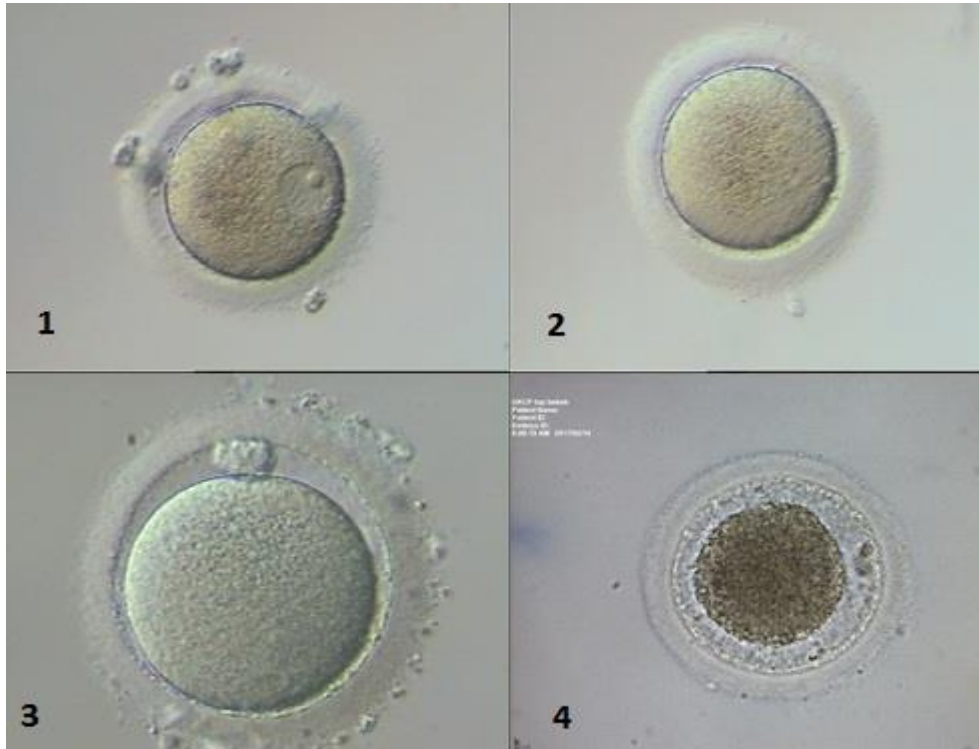
Oositlerin değerlendirilmesi oositin matürasyonu ve kalitesi yönünden ele alınır. Olgun ve iyi kaliteli oositler embriyo oluşumu, gebelik şansı ve sağlıklı doğumu olumlu yönden etkilediği bilinmektedir. Oosit matürasyonu nükleer ve sitoplazmik matürasyon olarak iki grupta değerlendirilir⁽¹⁸⁾.

Oosit çekirdek matürasyonunun belirli özellikler;

Germinal vezikül: Oosit içinde çekirdek zarı yıkılmamış oosit mayoz II'nin profaz I evresinde kalmış durumdadır.

Metafaz I: Oosit içi çekirdek zarı yıkılmış ancak oosit metafaz II evresine girmemiştir. Kutup cisimciği (Polar body) oosit dışında perivitellin aralığa atılmamıştır.

Metafaz II: Matür oosit olarak bilinir. Oosit zona pellüsida ile oosit zarı arasında bulunan perivitellin aralığında kutup cisimciği gözlenmesidir.(Resim 2)



Resim 2:1-Germinal Vezikül safhasında oosit 2- Metafaz I oosit 3- Metafaz II (Matür oosit) 4- Dejenere oosit (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

Morfolojik yönden oosit değerlendirmesinde normal olarak kabul edilen bir oositin zona pellisudasının kalınlığı 6.0 - 7.0 μm , kutup cisimciği 5,0-7,0 μm çapında ve oositin ortalama büyüklüğü 120-130 μm çapında olmalıdır (19). Sitoplazmik matürasyon değerlendirmesinde oositin sitoplazmasının içi homojen, parlak bir görüntüye sahip ve oval şekilde olması normal olarak kabul edilir. Diğer türlü farklı şekillerde bulunması oositte morfolojik yönden anormal olarak kabul edilir. Oositlerin çekirdek, sitoplazmik ve morfolojik yönden değerlendirmesi ve iyi kalite olması IVF uygulamalarında önemli bir unsurdur. Çünkü kaliteli oositlerde döllenme, klivaj, blastokist gelişimi, gebelik oluşumu ve sağlıklı doğum üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir⁽¹⁹⁾.

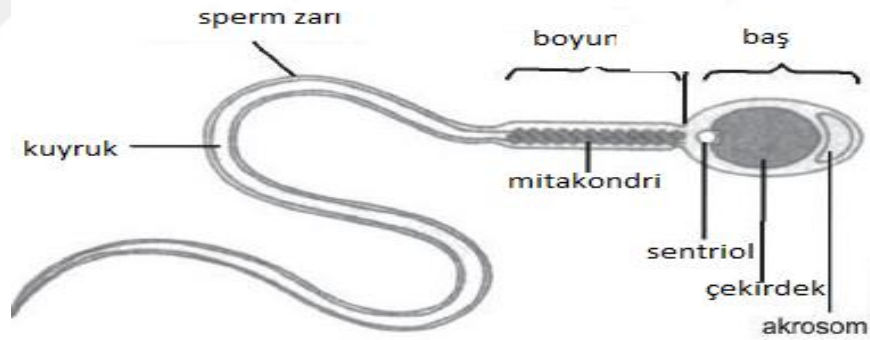
2.2.2. Spermatozoonların Değerlendirilmesi

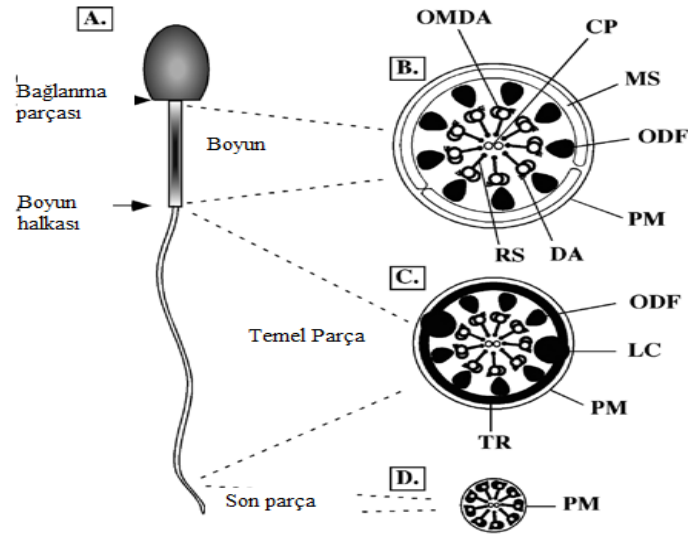
Spermilerin androloji laboratuvarında incelenmesi için öncelikle elde edilmiş şeklinin bilinmesi gerekmektedir. Normal ejakülasyonla elde edilecek sperm doğru bir sonuç verebilmesi için ilk olarak örnek verecek kişinin belirli bir süre cinsel perhiz (3-7 gün) yapması gerekmektedir. Ejakülasyonla alınacak sperm steril bir kaba toplanmalıdır. Analizi yapılacak sperm laboratuvar ortamında makroskobik ve mikroskobik olarak değerlendirilir. Makroskobik incelemede renk, koku, ph, viskosite ve volüm parametreleri dikkate alınır. Mikroskobik incelemede hareket, sayı, morfoloji ve sperm dışı hücrelerin incelenmesi yapılır⁽²⁰⁾.

Spermatozoonların mikroskop altındaki morfolojisi 3 ana bölümden oluşur. Bu bölümler baş, orta kısım ve kuyruktur. Spermatozoonların baş bölgesinde genetik materyali bulduran çekirdek ve ön üç kısımda da akrozom bulunmaktadır. Akrozom oositin zona pellusida ve korona radiata'yı delmeye ve spermatozoonun oositin içine girmesini

sağlayan (akrozin, hiyaluronidaz vb.) enzimleri bulundurur. Spermatozoonun orta kısım bölgesi ise çekirdeğe bağlanmış proksimal sentriyol ve aksonem'e kaynaklık eden distal sentriyol'den meydana gelmiştir. Spermatozoonun kuyruk bölümü; orta, ana ve son parçadan oluşmaktadır. Orta parçanın, spermatozoon kuyruğunun boyun bölgesinden sarmalimsi dizilmiş mitokondriyal kılıfın sonuna kadar gittiği ve 9+2 yerleşimde mikrotübüller aksonem santralini oluşturduğu bilinmektedir⁽²¹⁾. (Şekil 2)

Annulus (son halka) üç bölümünün altında bulunan yoğun bir halkadır ve orta parçanın esas parçaya dönüştüğü bölge olduğu bilinmektedir. Esas parça annulustan uzanır ve mitokondriyal sarmal içermez. Merkezi aksonemin dışı yoğun lifler ve bir fibröz kılıftan oluşur. Spermatozoon kuyruğu inceldikçe, dışta bulunan lifler ve fibröz yapı biter. Son parça, sadece plazma zarı ile sarılmış 9+2 mikrotübüler aksonemden oluşur⁽²¹⁾.





Şekil 2: **Spermatozoon çizimi**; Memeli spermnin ultrastrüktürel yapısının çizim ile gösterilmesi (A) Memeli sperm flagellumu dört kısımdan yapılmıştır: Başa bağlanma kısmı, orta kısım, esas kısım ve son bölge. Orta kısım sonunda esas kısım başlar ve annulus ile ayrılır (B). Şematik enine kesitte orta kısımda plazma membranı (PM) ve mitokondriyal alan içinde (MS) şematik çizimde plazma membranı (PM) ve mitokondriyal bölge (MS) 9 çift mikrotubul bulunur, aksonem yapısını oluşturur. Mikrotubuller arasında radyal bağlantılar dynein kollarını oluşturur (DA). Ayrıca merkezi çift mikrotubul yer alır. Esas kısımda fibröz proteinlerin oluşturduğu bir tabaka yer alır. Fibröz alan son kısımda görülmez. (Turner RM. **Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?** J Androl. 2003 Nov-Dec;24(6):790-803.)

Normal bir morfolojiye sahip spermatozoonun döllenme ve embriyonun gelişimi için önemli bir faktör olduğu bilinmektedir⁽²⁰⁾.

2.2.2.1. Semen Analizi

Ejakülden sperm hazırlaması veya yıkaması IVF'de en önemli işlemlerden biridir. Doğru yapılmış sperm analizi ve hazırlığı IVF başarı şansını oldukça artırır ve ICSI işleminde oldukça kolaylık sağlar. Ejakülden yıkanıp hazırlanması için değişik yöntemler bulunmaktadır, bu yöntemlerden hangisinin tercih edileceği ise ejakülden yapılan ilk inceleme ile belli olur. Bu ilk incelemeye bazal değerlendirme denir. Ejakülden hazırlanmasında kullanılacak yöntem hastalara göre değişebileceği gibi aynı hastanın farklı zamanlarda alınan örnek durumlarına göre de değişebilmektedir. Örnek

vermek gerekirse; daha önce yapılmış olan semen analizinde, hacmi ve konsantrasyonu yüksek bulunan bir ejakülatın IUI işlemi için tamamı kullanılırken ICSI işlemi için küçük bir kısmı kullanılabilir⁽²⁰⁾.

Sperm hazırlamasında temel iki yöntem vardır: Yıkama ve doğrudan yüzdürme ya da yoğunluk sıralayıcısı (gradient) yöntemleridir. Ejakülatın yıkanmasında farklı kültür solüsyonları kullanılabilir. HTF (human tubular fluid) solüsyonu bu amaçla kullanılmaktadır⁽²⁰⁾. (Tablo 1)

Bir erkeğin semen analizine doğru karar vermek için her biri arasında 7 günden az ve 3 haftadan uzun olmamak üzere en az 2 örnek incelenmelidir. Örnekler alınmadan önce erkek 48 saatten kısa ve 7 günden uzun olmamak üzere cinsel perhizli olmalıdır. Yapılan bu analizler sonuçlarına bakıldığında çok fazla fark olursa analizler tekrarlanmalıdır⁽²⁰⁾.

Tablo 1: Dünya sağlık örgütü 2010 semen kriterleri (**Dünya Sağlık örgütü 2010**)

Parametre	En düşük Referans
Semen volumü (ml)	1.5
Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	15
Total sperm sayısı (10^6 /ejakülat)	39
Progressive motilite (PR, %)	32
Total motilite (PR +NP, %)	40
Vitalite (canlı spermler, %)	58
Sperm morfolojisi (NF, %)	4
pH*	≥ 7.2
Lökosit* (10^6 /ml)	<1

2.2.2.2.Yıkama ve doğrudan yüzdürme metodu

Semen 1,5-2 kat volüm içerecek şekilde HTF solüsyonu ile karıştırılır. 1500 rpm de santrifüjlenir. Üstte kalan supernatan atılır ve işlem bir kez daha tekrarlanır. Supernatan üzerine 45 derecelik eğimle 1 ml HTF solüsyonu yavaşça eklenir, 30-45 dakika sonra üst faza yüzen spermier alınarak kullanılır⁽²⁰⁾.

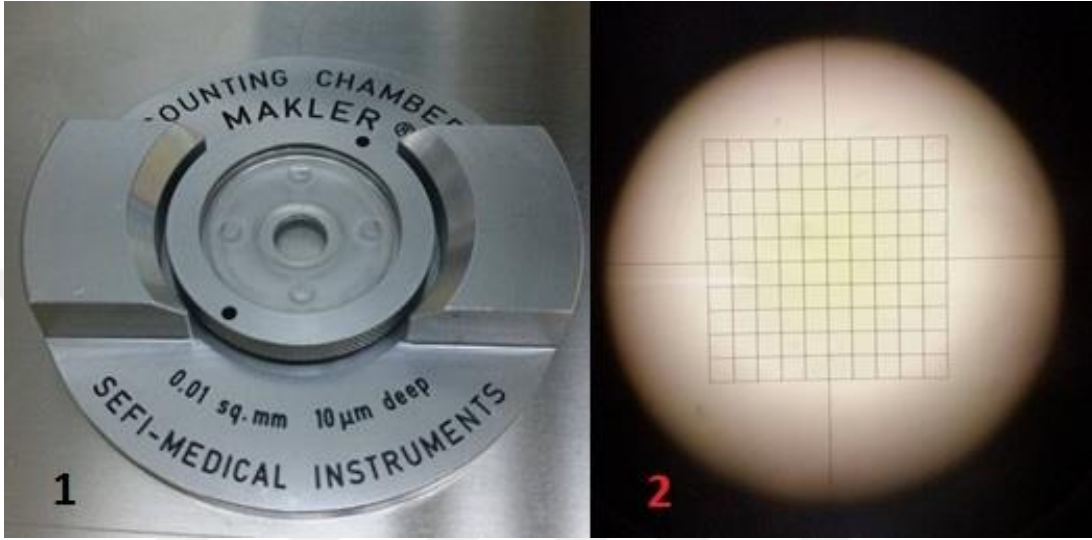
2.2.2.3. Yoğunluk sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi

Yoğunluk sıralayıcı (Gradient) yöntem anormal spermier ile sperm dışı hücrelerin ara fazlarda kalması ve normal hareketli spermierin dibe çökmesi prensibine dayanır. Bu amaçla kullanılmak üzere silan kaplı silika partikülleri içeren sperm için fizyolojik sayılabilecek değişik yoğunlukta solusyon preparatlar vardır. Tabakalar hazırlanırken en yoğun olan her zaman en alta olacağından normal spermde santrifüj sırasında bu en yoğun tabakaya göç eder ve çökelti oluşturur. Semende bulunan diğer bileşenler ve anormal spermier yoğunluk farkından dolayı daha az yoğun olan üst katmanlarda kalır ve böylece normal morfolojiye sahip sperm ejakülattan ayrılmış olur. Gradient yöntemi, semende hareketli sperm/toplam sayı oranının düşük olduğu, sperm dışı hücre sayısının yüksek olduğu durumlarında ve anormal sperm oranı yüksek olan olgular da özellikle kullanılmaktadır. Rutin kullanımda iki tabakalı gradient kullanımı yeterli olmaktadır⁽²⁰⁾.

2.2.2.4. Sperm konsantrasyonunun Makler® sayma kamarası ile ölçümü

Sperm sayı ve hareket değerlendirmesinde Makler® sayma kamarası önemli bir kolaylık sağlamaktadır. 4 µl semen Makler® kamarasının gerekli bölgesine konur. Hava kabarcığı oluşturmadan üzeri kapatılır. Işık mikroskopunda x20 objektif ile 10 kare sayılır ve sonuç milyon olarak ifade edilir. Sperm sayısı çok düşükse tüm saha sayılmalıdır. Sırasıyla ileri doğru

hızlı ve yavaş hareketli sperm sayılır daha sonra yerinde hareketli ve hareketsiz spermler sayılır. Sayım ne kadar geçikirse kamaranın sayım bölgesi dışında bulunan spermler sayma bölgesine doğru hareket ederler bu durumda yanlış sonuçlara neden olur. Bu nedenle sayım mümkün olduğunca hızlı gerçekleştirilmelidir⁽²²⁾. (Resim 3)



Resim 3: 1-Makler kamarası görseli, 2-kontraks mikroskop altında makler kamarası görüntüsü (U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır)

2.2.2.5. Kruger Kriterlerine Dayalı Sperm Morfolojik (şekilsel) Değerlendirme

İnfertilite tedavisinde normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinin seçilmesi, infertilite tedavisinde son derece önemlidir. Spermatozonlarda morfolojik değerlendirme kruger kriterlerine göre yapılmaktadır. Buna göre baş, akrozom, çekirdek, boyun, kuyruk ve orta parça anormallikleri değerlendirilmektedir. Diff quick, hematoxylin veya giemsa boya ile boyanan spermler immersion (x100) objektifinde incelenir, akrozom ve çekirdek anomalileri ile orta kısım ve kuyruk anomalileri sayılır, yaklaşık 200 sperm sayılarak normal morfoloji oranı elde edilir⁽²³⁾.

2.2.3.IVF (in vitro fertilizasyon) Yöntemi

Bu yöntemde ilk sağlıklı doğum 1978 yılında gerçekleşmiştir. Yöntem temel olarak kadının ovaryumlarından alınan oositler ile erkekten alınan sperm laboratuvar ortamında aynı ortamda bırakılarak döllenmelerini sağlamak ve oluşan zigotu anne rahimine transfer etmek üzerine kurulmuştur⁽²⁴⁾.

Bu yöntemde kadından elde edilen oosit çevresine 100,000 adet sperm konur ve böylece oosit ile 1 adet sperm birleşmesi sağlanır. Döllenme gerçekleşmesinden sonra embriyo gelişimi takip edilir ve 3. veya 5. gün embriyo annenin rahimine kateter yardımıyla transfer yapılması üzerine dayanmaktadır⁽²⁴⁾.

Bu yöntemin başarısını, erkekten elde edilen sperm kalitesi önemli derecede etkilemektedir. Düşük sayıda ve kalitedeki sperme sahip infertil çiftlerinde yöntem başarısı düşüktür⁽²⁵⁾.

2.2.4.ICSI (intrastoplasmik sperm enjeksiyonu) Yöntemi

Günümüzde en yaygın kullanılan ve 1993 yılda ilk uygulandığı günden itibaren sperm kaynaklı infertilitede önemli bir başarıya sahip olan bir yöntemdir.

Yöntem mikromanipülatör denen bir cihaz yardımıyla sperm ve oositin doğrudan kontrollü olarak birleştirmesi üzerine dayalıdır⁽²⁶⁾.



Resim 4: Mikromanüplatör resmi (U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır TE300410709, Nikon®)

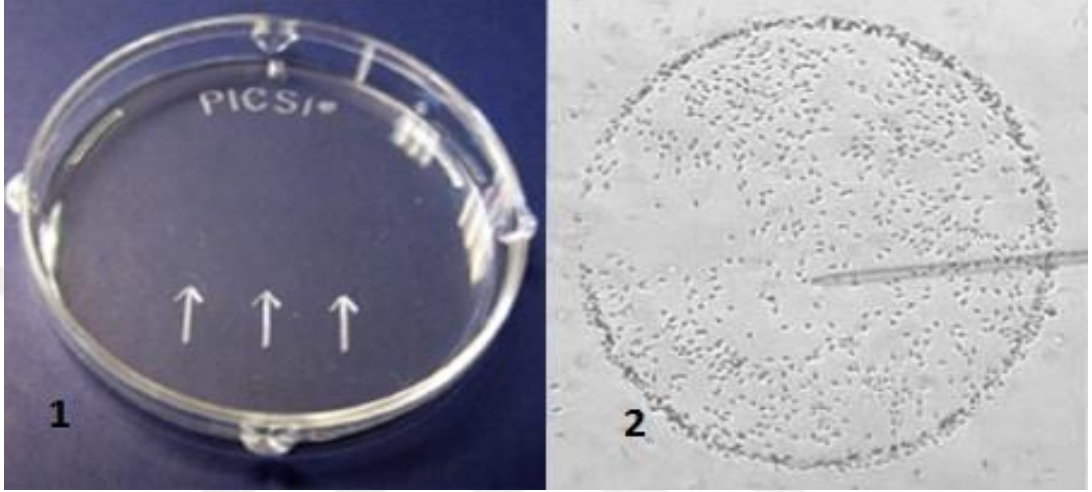
Bu yöntemin prensibi; kadın ovaryumun'dan invazif yöntemle gerekli büyüklüğe erişmiş folüküllerden oositler toplanır. Toplanan oositlerin dış bölgesinde bulunan kümülüs hücreleri uzaklaştırılır. Olgun (mayoz 2'nin metafaz 2 evresindeki oositler) ve normal morfolojiye sahip yumurtalar ICSI işlemi için kullanılmaya uygundur. Diğer taraftan yumurtayı dölleyecek olan spermier gerekli yıkama işlemi yapılarak hazırlanır ve mikromanüplatöre bağılı invert mikroskop altında oosit ve spermier gerekli kurallara uygun olarak iğne yardımıyla birleştirilir. Her bir yumurtaya bir adet sperm enjeksiyonu yapılması gerekmektedir⁽²⁶⁾.

Bu yöntem şiddetli oligospermi, astenospermi ve teratospermi hastaları için önemli bir başarı sağlamıştır. Böylece sperm kaynaklı infertilite başarısızlığı çok önemli derece ortadan kaldırılmıştır.

2.2.5.PICSI Yöntemi

PICSI yöntemini ayıran en önemli fark işlemin özel PICSI petrisinde yapılmasıdır. Yöntem presip olarak spermierin doğal

fertilizasyonda kümülüs hücrelerinin matriksinin temel birleeni olan hyalüronan bağlamlanmasına dayalıdır. Kümülüs yüzeyinde bulunan bu birleene spermlerin bağlanması onların olgun, yüksek DNA btnlğine sahip, doğal kromozomal yapıya sahip ve doğal dölleme yeteneği olduğu bildirilmektedir⁽²⁷⁾.



Resim 5: 1. PICSI petisi görüntüsü, 2. PICSI petisinin sperm hyaluronan bağlanma görüntüsü. (ORIGIO®)

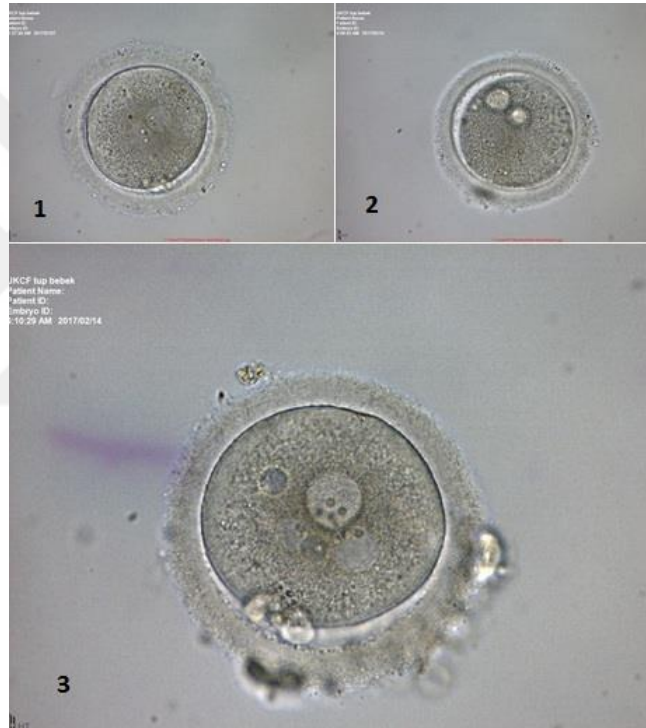
Bu yöntemin genel prensibi olarak özel olarak üretilmiş PICSI petisinin belirli yerlerinde hyalüronan birleeni bulunmaktadır. ICSI işlemi için hazırlanan spermler bu petri üzerindeki özel yerlere konulur. Petri zerine ICSI işlemi için gerekli hazırlıklar yapılır ve mikromanplatrde sperm seçimi bu özel yerlere tutunmuş olan spermler arasında yapılır. Seçilen bu spermler ile oositlerin içine sperm enjeksiyonu yapılmasıdır⁽²⁷⁾. (Resim 5)

Bu yöntem sayesinde olgun sperm seçimi sağlandığı düşünülmektedir. Seçilen spermlerin DNA bütünlüğünün maksimum olduğuna inanılmaktadır⁽²⁷⁾.

2.3.İN VİTRO ORTAMDA EMBRİYO GELİŞİMİ

2.3.1. Döllenme ve Pronükleus Skorlanması

ICSI işleminden 14-16. saat sonrasında fertilizasyon kontrolü yapılır. Oosit sitoplazmasında iki pronükleusun görülmesi fertilizasyonun gerçekleştiğini gösteren en önemli bulgudur. Pronükleusların morfolojik özellikleri embriyo kalitesinin belirlenmesinde önemli bir katkısının olduğunu belgeleyen çalışmalardan sonra pronükleus görünümü embriyo seçim kriterleri arasında yer almıştır⁽²⁸⁾. (Resim 6)



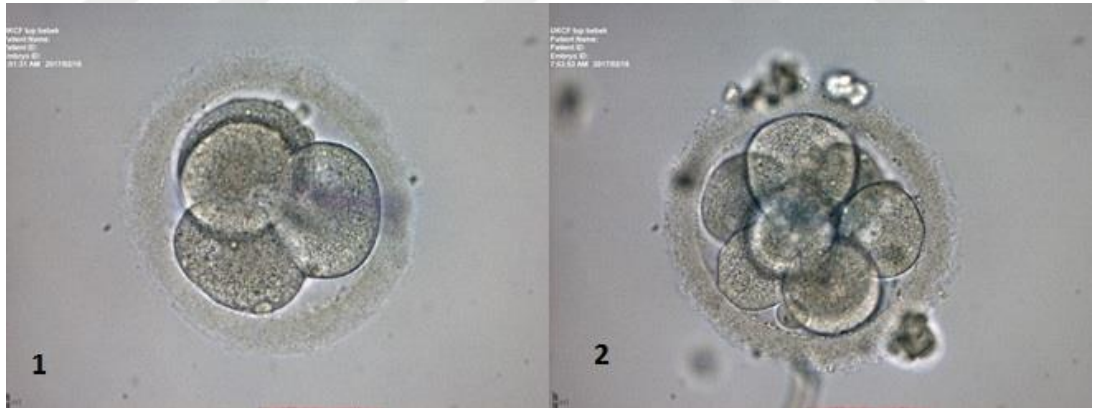
RESİM 6: 1.tek pronukleus 2. iki pronukleus 3. çoklu pronukleus **(U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır)**

Pronükleusların yerleşim ve büyüklüklerinin yanı sıra pronükleer gelişim sırasında oluşan çekirdekcik öncüllerinin (NPB) sayısı, büyüklüğü ve dağılımı da embriyoner gelişim ile ilişkilendirilmiştir. NPB'ler pronükleusların birbirlerine komşu yüzlerinde düzgün kolonlar oluşturacak biçimde sıralanmış olmalı veya her iki PN'da da dağınık olarak bulunmalıdırlar⁽²⁸⁾.

2.3.2.Embriyo Bölünmesi ve Değerlendirmesi

Zigot oluşumu sonrasında embriyo bölünme evresi başlar. Bu evrede; erken bölünme, bölünme hızı, blastomerlerin şekli ve büyüklüğünün değerlendirilmesinin yanı sıra embriyonun implantasyon potansiyelini önemli ölçüde etkileyen fragmantasyon oranı ve çoklu çekirdek (multinükleus) varlığı ile değerlendirilmelidir⁽²⁹⁾.

Erken Bölünme: İn vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarından inseminasyon veya ICSI sonrasında fertilize olan embriyoların bir bölümünün 23-28. saatlerde ilk mitoz bölünmeyi gerçekleştirerek iki hücreli embriyoya dönüştüğü gözlenmiş ve bu embriyoların gelişim ve implantasyon potansiyellerinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Rutin olarak yapılan 25-26. saat gözlemlerinde zigotların iki hücreli evreye geçmesi kadar pronukleusların görülmediği dönem de (pronuklear breakdown) zigotun gelişim potansiyelinin yüksek olduğu şeklinde değerlendirilmelidir⁽²⁹⁾.



Resim 7: 1-4 hücreli embriyo 2. Gün embriyosu 2-8 hücreli 3. Gün embriyosu (**U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır**)

Bölünme Hızı: İyi kalitedeki embriyoların 2. günde (42- 44. saatleri) 4-5, 3. günde de (66-68. saatler) 6-8 blastomerli olması gerekir. Bu bölünme hızı ideal olarak kabul edilir. Bundan hızlı veya yavaş olması embriyonun blastokiste gidişi düşürmektedir⁽²⁹⁾. (Resim 7)

Blastomer Büyüklüğü: Eşit olmayan hücresel bölünme de embriyo kalitesi ve embriyoner gelişim kapasitesi hakkında bilgi vericidir. Blastomerleri eşit olmayan embriyo transferiyle elde edilen implantasyon ve gebelik oranlarının düşük olması; iki kardeş hücre arasında hayati önemi olan mRNA, mitokondri, protein ve hücre organellerinin eşit paylaşılamadığından kaynakladığı düşünülmektedir⁽³⁰⁾.

Fragmantasyon: Embriyo seçim kriterleri arasında bölünme hızı ve blastomer büyüklüğünün yanısıra fragmantasyon derecesi de yer almaktadır. Fragmantasyon miktarı, dağılımı ve embriyo hacmine oranı derecelendirilerek embriyo kalitesini belirlemektedir. Programlanmış hücre ölümünden (Apopitozis) kaynaklandığı bilinen ve embriyoner gelişimin her evresinde gözlenen bir durumdur. Fragmantasyon miktarı <%20 olan embriyolarda implantasyon oranının belirgin olarak düşürmediği gözlenmiştir⁽²⁹⁾.

Çoklu Çekirdek(Multinukleasyon): Embriyoyu meydana getiren blastomerler arasında birden fazla sayıda nükleüs içermesi durumudur. Multinükleer blastomeri olan embriyoların anöploidi ve protein sentezinde de sorun olduğu gözlenmiştir⁽²⁹⁾.

2.3.3.Blastokist Değerlendirmesi

Blastosist gelişiminden önce embriyonun 4. gün özelliklerinin bilinmesi gerekir. Embriyo, 3. günde 6-8 blastomerlidir ve 4. günde kompaktlaşma evresine girmesi beklenir. Kompaktlaşma embriyoyu oluşturan blastomer sınırlarının seçilemediği, embriyonun kompakt bir yapı oluşturduğu dönemdir. Her ne kadar laboratuvar uygulamalarında erken veya geç dönemde kompaktlaşan embriyolarla karşılaşılsa da genellikle embriyoner gelişimin 4. gününde, gerçekleşmesi gereken bir olgudur⁽³¹⁾.

Embriyolar kompaktlaşmayı izleyen 5. günde çok daha farklı bir görünüm aldığı gözlenir ve bu dönemde embriyo blastokist olarak tanımlanır. 4. gün sonu veya 5. günde kompakt embriyonun iç kısmında boşlukların (kavitasyon) olduğu gözlenir⁽³¹⁾. Zamanla bu boşluklar birbirleriyle birleşerek embriyo içinde büyük bir boşluk meydana getirirler (blastosel) ve bu dönemden itibaren embriyoner hücreler de farklılaşma gözlenir: Trofoektodermal hücreler ve embriyoyu oluşturacak olan iç hücre kitlesi gelişimi gözlenir. Trofoektodermal hücreler embriyoyu dıştan kesintisiz olarak saran, birbirleriyle ilişkili tek katlı yassı hücrelerden oluşmuştur. İç hücre kitlesi ise blastoselin ortasında, birbiriyle ilişkili, poligonal hücrelerden meydana gelir⁽³²⁾.

Blastokist gelişimine devam ederken blastosel boşluğu genişler ve bu sırada zona pellusida (ZP) giderek incilir. Blastokist transferi uygulamalarında blastokistin kalitesi de yukarıda tanımlanan hücrelerin varlığı ve özellikleriyle blastosel boşluğunun genişlemesi ve ZP'nin incilmesi ile değerlendirilir⁽³²⁾.

Blastokist gelişimi dinamik bir olaydır. ZP'nin incilmesiyle trofoektodermal hücreler fıtıklaşmaya başlar ve embriyo ZP'den çıkmaya başlar buna hatching adı verilen bu gelişme zamanla daha da ilerleyerek embriyonun ZP'dadan tamamen ayrılmasıyla sonuçlanır (total Hatching) ⁽³²⁾.

IVF'de blastokist transferi uygulamaları son 15 yılda yaygınlık kazanmış olsa da teorik bilgilerle birleştirildiğinde yukarıdaki gelişmeleri görmek artık hemen her laboratuvarın rutin bulguları arasında yer almaktadır.

Blastokist transferinde de blastokist kalitesini belirlemek üzere sınıflandırmalar geliştirilmiştir ve bu aşamada trofoektodermal hücreler, iç hücre kitlesi, blastosel boşluğunun büyüklüğü ve ZP'nin kalınlığı dikkate alınmaktadır⁽³²⁾.

Erken blastokist: Blastosel embriyo hacmini yarısından daha küçüktür (1) (32).

Blastokist: Blastokist embriyo hacminin yarısından daha büyük bir alanı kapsar (2) (32).

Genişlemiş blastokist (*expanded blastocyst*): Blastokist hacmi erken blastokistten daha büyüktür ve ZP incelmeye başlamıştır (3) (32).

Zonadan çıkmaya başlayan blastokist (*Hatching blastocyst*): Blastokist zonadan çıkmaya başlamıştır (4) (32).

Tamamen zonadan kurtulmuş blastokist (*Hatch blastocyst*): Hatching tamamlanmış ve zona pellusida embriyo yüzeyinden sıyrılmıştır (5) (32).

İç hücre kitlesi:

Sıkıca bir araya gelmiş poligonal hücrelerden oluşan bir hücre kitlesi (A) (32).

Gevşekçe bir araya gelmiş az sayıda hücre içeren iç hücre kitlesi (B) (32).

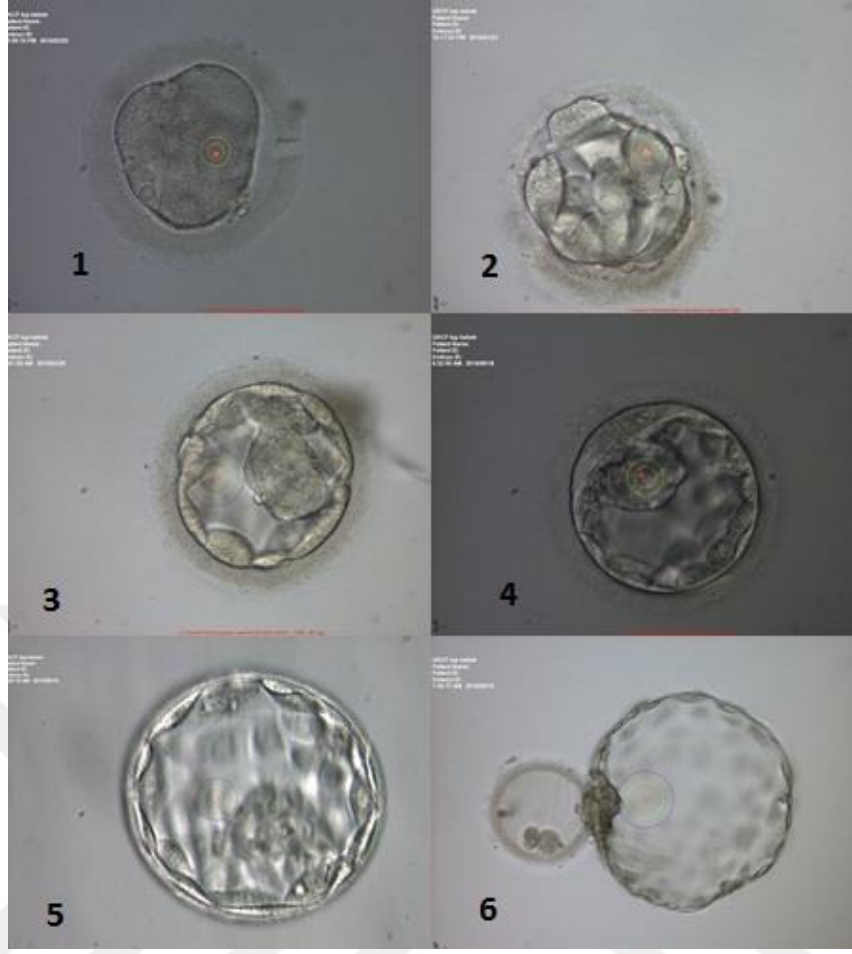
Çok az hücreye sahip iç hücre kitlesi olarak sınıflandırılır (C) (32).

Trofoektodermal hücreler:

Kesintisiz, tek katlı yassı ve çok sayıda hücreden meydana gelmiş trofoektoderm (A) (32).

Gevşek düzenlenmiş, az sayıda hücre içeren trofoektoderm (B) (32).

Çok az sayıda ve büyük hücrelerden meydana gelmiş trofoektoderm (C) olarak sınıflandırılabilir⁽³²⁾. (Resim 8)



Resim 8: 1- CM Kalite blastosist, 2- 1 Kalite blastosist, 3- 2 Kalite blastosist, 4- 3BC Kalite blastosist, 5-4AB Kalite blastosist, 6- 6CB Kalite blastosist (Hatching blastosist) **(U.K.F.C.A. tüp bebek laboratuvarında alınmıştır.)**

Embriyo seçim kriterleri sadece transfer edilecek embriyoların belirlenmesinde değil dondurulacak embriyoların seçiminde de kullanılması gereken bir skorlamadır⁽³⁴⁾.

2.4.PGT (Preimplantasyon Genetik Tanı)

Ebebeynlerden bir veya her ikisi birden bir mutasyon veya dengeli kromozom anomalisi taşıyorsa, bu çiftlerin embriyolarına anomalilerin geçip geçmediğini öğrenmek amacıyla implantasyon öncesinde embriyolara yapılan testlerin genel tanımıdır.

Embriyoların implantasyon öncesi bu genetik tanı yöntemleriyle sağlıklı bebek doğumu amaçlanmıştır.

2.4.1.Kromozomlar

İnsan kromozomlarının sayısının 46 olduğu Tjio ve Levan tarafından 1956 yılında, insan somatik hücre kültürlerinde gösterilmiştir⁽³⁵⁾. Bugün ise insan kromozomlarının sayısının kesin 46 olduğu bunların 44'ünün otozomal kromozom ve diğer ikisinin cinsiyet kromozom olduğu belirlenmiştir. Cinsiyet kromozomları kadında XX, erkekte ise XY kromozomları biçimindedir⁽³⁵⁾.

2.4.1.1.Kromozomların İşlevleri

- 1) Kromozomlar, organizmanın genetik yapı taşları olan genleri taşırlar. Bu yüzden kromozomlarda meydana gelen sayısal ya da yapısal bozukluklar organizmada büyük hatalar oluştururlar⁽³⁶⁾.
- 2) Kromozomlar hücre bölünmesi sırasında, çok sayıda olan genleri, düzgün ve kolay bir şekilde yavru hücreye aktaran paket görevi yaparlar⁽³⁶⁾.
- 3) Kromozomlar, birbirine yakın olan bağlı genlerin bu bağlılığını koruyacak biçimde yavru hücreye geçişini sağlarlar. Bu olay genetik yapıdaki belirli özelliklerin sürekliliği için gereklidir⁽³⁶⁾.

2.4.1.2.Kromozom Morfolojisi

46 tek ya da 23 çift olan insan kromozomları mikroskop altında, hücre bölünmesinin metafaz evresinde kolaylıkla görülebilmektedir⁽³⁷⁾.

DNA yapıları histon proteinleriyle sarılmasıyla kromatin yapıları oluşur. Kromatin, DNA'nın hücre bölünmesi esnasında sentezlenen, protein bir zarf ile paketlenerek sentromer ile birbirine tutturulmuş iki kopyasından her biridir. Kromatidlere aynı zamanda eş kromozomlar da denir. Kromozom eşlenmesi sonucunda oluşurlar ve iki kromatit bir araya gelerek kromozomu oluşturur. Mitoz bölünme esnasında her bir kromatin profaz evresinde eşlenerek yeni oluşacak hücrelere yönetici moleküller olarak geçerler ve

böylece her iki hücre de aynı kalıtsal özelliklerine sahip olur. Telomer, bir kromozomun ucunda, kromozomun sonunu bozulmadan veya komşu kromozomlarla kaynaşmadan koruyan tekrarlayan nükleotid dizilerinin bir bölgesidir. Kromozom replikasyonu sırasında, DNA'yı kopyalayan enzimler çoğaltılmalarını bir kromozomun sonuna kadar sürdüremez, bu nedenle telomerler her çoğaltılmada kromozomun sonu kısalır. Sentromer, Kromozom üzerinde iğ ipliğinin tutunduğu nokta. Kromozomlarda kardeş kromatitleri bir arada tutan kısma verilen addır⁽³⁸⁾.

Kromozomlar, sentromerin kromozom kolları ile ilişkisi gözönüne alınarak sınıflandırılmaktadır. Sentromer, kromatitleri tam ortadan birbirine bağlayarak oluşuyorsa metasentrik. Bir ucana daha yakın olduğunda submetasentrik, tam uçta olduğunda ise akrosentrik kromozom tipi olarak değerlendirilir⁽³⁷⁾.

2.4.1.3.Kalıtsal Hastalıklar Genetiği

PGT ile üç grup hastalığın tanısı koyulabilir:

- 1-Tek gen hastalıkları
- 2-Üçlü tekrar hastalıkları
- 3-Kromozomal anomallikler

Tek gen hastalıkları, otozomal (kromozom 1-22) veya seks kromozomlarının (X ve Y) etkiliyebilmektedir. Tek gen hastalıkları otozomal resesif, otozomal dominant ve X'e bağlı geçişlidirler. Üçlü tekrar hastalıkları kromozom üzerinde baz çiftlerinin üçlü tekrarının artışından kaynaklanan hastalık grubudur. Translokasyonlar ve inversiyonlar gibi kromozomal anomallilikler fetusun dengesiz kromozom yapısında olmasına neden olabilir⁽³⁹⁾.

Kromozomlar eşler halinde bulunduğundan genlerin iki kopyası mevcuttur. Bir istisna olarak erkeklerdeki cinsiyet kromozomları X ve Y olarak

bulunmaktadır. Genetik olarak aktarılan hastalıkların büyük bir çoğunluğu belirli bir gendeki mutasyondan kaynaklanmakta olup bu durum genin inaktif veya bozuk olmasına yol açar. Mutasyon, genin bir veya her iki kopyasında bulunmasına göre hastalığın oluşmasında kalıtımın tipine bağlıdır. Hastalığa neden olan mutasyonlar gendeki bazların tek birindeki bir değişiklik veya daha karmaşık değişikliklerden kaynaklanabilmektedir. Bu değişiklik baz dizisindeki delesyon, yer değiştirme veya insersiyon olabilir⁽³⁹⁾.

2.4.1.4.Kromozomal Anormallikler

Bütün kromozomları içeren anomallikler genellikle ölümcüldür. Turner Sendromu (XO), Klinefelter Sendromu (XXY), gibi cinsiyet kromozomları veya Down Sendromu (21. Kromozomdan 3 kopya bulunması) hayatla bağdaşan hastalıklar arasındadır⁽³⁹⁾.

En sık görülen kromozom anormaliği, iki kromozomun kırılıp karşı kromozomda yeniden birleştiği kromozom translokasyonudur. Kromozomlar halen dengeli ise genetik materyalin tümü vardır ve hasta dengeli translokasyona sahip olarak tanımlanır. Dengeli translokasyon taşıyan hastaların birçoğunun üreme denemelerinde gametlerde dengesiz kromozom bileşenleri görülerek anormal kromozomlu (dengesiz translokasyon) embriyo oluşumu gerçekleşir. Bu yüzden dengeli translokasyon taşıyıcılarında, tekrarlayan düşük, anormal kromozomlu çocuk doğumu veya infertilite görülebilir⁽³⁹⁾.

Kromozom anormallikleri;

A)Yapısal kromozom anormallikleri

B)Sayısal kromozom anormallikleri

Olmak üzere iki grupta incelenirler.

A)Yapısal Kromozom Anormallikleri

Kromozomların yapısal olarak değişmesiyle ortaya çıkan anomalliklerdir. Temel olarak 6 farklı türde yapısal kromozom anormaliği bulunmaktadır⁽⁴⁰⁾.

-Delesyonlar: Kromozomun yapısından bir parçanın kaybolmasıdır. Bilinen örnekleri; kromozom 4'ün kısa kolunda bir parçanın kaybolmasıyla meydana gelen Wolf-Hirschhorn sendromu ve 11. kromozomun uç (terminal) kısmında meydana gelen delesyon ile görülen, Jacobsen sendromudur⁽⁴⁰⁾.

-Duplikasyonlar: Bir kromozomun bir parçasının kendini eşlemesiyle, fazla genetik materyal oluşturmasıyla sonuçlanan düzensizliklerdir. Bloom sendromu ve Rett sendromu örnek olarak gösterilebilir⁽⁴⁰⁾.

-Translokasyonlar: Bir kromozomun ya da kromozom parçasının diğer bir kromozom ile birleşmesiyle meydana gelen düzensizliklerdir. İki çeşidi vardır. Resiprokal translokasyonlarda iki farklı kromozomdan parçalar karşılıklı değişir. Robertsonian translokasyonlarda, bütün bir kromozom diğerinin sentromerine birleşir. Bu yalnızca, 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlarda görülür⁽⁴⁰⁾.

-İnversiyonlar: Kromozomdaki bir kısmın kopup, ters dönüp daha sonra tekrar aynı yere birleşmesiyle meydana gelen düzensizliklerdir⁽⁴⁰⁾.

-Ring kromozomlar: Kromozomun bir parçasının kopup, daha sonra halka şeklinde kendiyile birleşmesiyle meydana gelen düzensizliklerdir. Genetik materyal kaybı olmadan ya da olarak gerçekleşebilir⁽⁴⁰⁾.

-İzokromozom: Normalde bir kromozom boyuna (longitudinal) bölündüğü halde, kromozomun (transvers) enine bölünmesidir. Böyle bir bölünmede, replikasyon sonucunda uzun kolun duplikasyonu olmaktadır. Genellikle bu tür olay sentromerin üzerinde enine bölünme şeklinde bir yol izlemektedir. En sık görülen X izokromozomdur. Bu tür bölünme olayında klinik anormallik, kısa kolun monozomisi ve uzun kolun trisomisi biçimindedir. Y izokromozomu

canlı doğumlarda görüldüğü halde diğer kromozomların izokromozomu spotan düşük ile sonuçlanmaktadır⁽⁴⁰⁾.

-Sentrik fragment: Genellikle rutin karyotip sırasında rastlanan küçük ek, metasentrik fragmentlerdir. Bazen ailesel ve ana-babalarda ya da atalarında mayoz sırasında oluşan sentrik füzyon ve translokasyon sonucunda meydana gelmektedir. Sentrik fragment yalnızca repetetiv olarak ribozomal DNA içermektedir. Klinik bir problem vermez. Bazen transkribe genlerin varlığı çocuklardaki anomalilerle ilişkili olabilir⁽⁴⁰⁾.

B) Sayısal Kromozom Anomalikleri

Kromozomların sayısal anormaliği iki önemli temel mekanizma ile meydana gelmektedir:

a) Kromozomların ayrılamaması (non disjunction olayı): Kromozom anomaliklerini meydana getiren mekanizmalardan en önemlisi mayozda gametlere az ya da çok sayıda kromozom gitmesidir. Bu durum ya mayoz ya da mitoz bölünmede olabilir. Meydana gelen bu olayın sonunda kromozom anöploidisi oluşmaktadır. Nedeni ileri anne-baba yaşı, viral enfeksiyonlar, kimyasal ajanlar ve radyasyondur⁽⁴⁰⁾.

b) Kromozomların anafazda geri kalması (Anafaz lag olayı): Kromozomlar kutuplara çekilemezler. Ya kaybolur ya da bir tarafa katılırlar⁽⁴⁰⁾.

Kromozomların sayısal anormaliği 2 tipi şeklinde olabilir. Bunlar:

ÖPLOİDİ: Bu durumda kromozom sayısı o organizma türü için normal olan haploid sayısının tam katları biçiminde artmaktadır. Örneğin: İnsanda haploid sayı 23'tür, diploid sayı ise 46'dır. Haploid sayının 3 kat artması ile triploidi oluşmaktadır. (bu durumda total kromozom sayısı 69 dur) 4 katı artması halinde tetraploidi oluşurken kromozom sayısı 92 olmaktadır⁽⁴¹⁾.

Genelde bu katlar şeklindeki artışa poliploidi denmektedir. Poliploidinin nedeni hücre çekirdeği bölündüğü halde sitoplazma

bölünmesinin gerçekleşmemesinden meydana gelmektedir. Yani sitokinez olmamaktadır. Buna en iyi örnek endoreduplikasyon olayıdır. Endoreduplikasyon olayında kromatidler bölündüğü halde hücrede bölünme olmadığından, sentromerlerden bitişik 4-8 kromatid bir arada aynı hücrede görülmektedir. Poliploidiye en iyi örnek insan kötü huylu tümör dokusunda ve spontan düşük materyalinde gösterilmiştir. Haploid sayısını "n" olarak gösterirsek, triploidi 3n, tetraploidi 4n'dir. Öploidi tip kromozom anormallikleri yaşamla bağdaşmazlar⁽⁴¹⁾.

ANÖPLOİDİ: Kromozomal bozukluklar arasında en sık görüleni ve en önemli olanıdır. Klinik olarak tanı konan tüm gebeliklerin en az %3-4'ünde bulunmaktadır⁽⁴¹⁾. Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere anöploidi denir. Yani, diploid kromozom setindeki bir veya birden fazla kromozomun eksik veya fazla olmasıdır. Homolog kromozomlardan birinin eksikliğinde o kromozomun monozomisi, bir kromozomun fazlalığında ise kromozomun trizomisi denir. Bir kromozomdan iki tane fazla olması durumunda ise ilgili kromozomun tetrazomisi denir. İnsan sitogenetik uygulamalarında, anöploidi olgularına öploidi olgularından daha sık rastlanmaktadır⁽⁴¹⁾. Buna bağlı olarak pek çok kromozomal hastalığın nedeni anöploidiye dayanmaktadır. Başka bir ifadeyle anöploidi, fiziksel gelişim geriliğine veya zekâ gelişim geriliğine ya da ikisine yol açan ve fazla veya eksik kromozomlardan kaynaklanan bir hastalık durumudur. Döllenme esnasında, anöploidi sıklığı yaklaşık %10 olarak düşünülmektedir. Anöploidik anormal döllenmelerin büyük çoğunluğu, kendiliğinden düşük ve doğum öncesi ölüme bağlı olarak elimine edilmektedirler. Her ne kadar, nedenleri çok iyi anlaşılmış olmasa da, anöploidinin hücre bölünmesi sırasındaki kusurlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu kusurlar iki yolla oluşmaktadır⁽⁴²⁾:

1)KROMOZOM AYRILMAMASI: Bölünme evrsinde, kendini iki katına çıkaran kalıtsal madde ya da kromozomlar, metafaz evresinde hücrenin orta düzleminde toplanırlar ve sentromerlerinden uzunlamasına ikiye bölünürler. Bundan sonra, oluşan yarımlar ayrı kutuplara giderler ve bu şekilde bölünme olayı tamamlanır. Ancak, bir veya daha fazla kromozom uzunlamasına bölünmez ve normalde yarımlardan birinin bir kutba, ötekinin diğer kutba gitmesi gerekirken bu gerçekleşmez. Böylece, bir kutba iki yarım birden giderken diğer kutba kromozom gitmez. Bu olaya, kromozom ayrılmaması denir⁽⁴²⁾.

Bu olay, hem mitoz bölünme de hem de mayoz bölünmede görülür. Fakat bölünme türüne göre ortaya çıkan sayı farklı olur. Mitoz bölünmedeki kromozom ayrılmaması, döllenmeden sonraki evrelerde olacak olursa, kusurun ortaya çıktığı zamana bağlı olarak, kişinin hücrelerinin kromozom sayısı bir kısmında normalden fazla, bir kısmında normalden az olacaktır. Yani, kişinin hücrelerinin bir kısmı monozomik bir kısmı trizomik olacaktır. Böylece kişide mozaik olacaktır⁽⁴²⁾.

Kromozom ayrılmamasının en çok görüleni ve en önemli olanı, mayoz hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkanıdır. Kromozomun ikiye bölünüp her birinin ayrı kutuplara gidememesi sonucu, hücrelerden birinde söz konusu kromozom hiç bulunmaz iken diğer hücrede bir yerine iki tane bulunur. Buna karşılık, hücre bölünme kusuru sonucu ilgili kromozomu taşıyan gamet normal gametle birleşecek olursa, o zaman meydana gelecek zigotta normale göre bir kromozom eksik olacaktır. Böyle bireylere monozomik bireyler denir⁽⁴²⁾.

MOZAİSİZM: Aynı zigottan kaynaklanan bir organizmada, kromozom sayıları birbirinden farklı birden çok hücrenin bulunması durumuna mozaisizm denir. Mozaisizmin nedenler; mitoz bölünmedeki kromozom ayrılmaması ya da kromozomların anafazda geri kalmasıdır. Vücut hücrelerinde ortaya çıkan bu

durum, kişinin hücrelerinin değişik sayıda kromozom içermesine neden olur. Aslında, mozaisizmin derecesi kişinin yaşıyla ters orantılıdır. Eğer, zigotun erken evresinde anormalik ortaya çıkarsa mozaiklik derecesi fazla geç evrelerinde ya da doğumdan sonra ortaya çıkarsa mozaiklik derecesi az olur⁽⁴³⁾.

Sık rastladığımız mozaik hastalar 46, XX/47,XX,+21 şeklindedirler. Normal hücre serisinin varlığı klinik belirtilerde hafiflemeye yol açmaktadır. Anormal hücre serisi gonadla sınırlanmış ise bazen normal bazende anormal çocuk oluşumu birbirini izleyebilir(gonadal mozaisizm)⁽⁴⁴⁾.

Kromozom mozaizmi, zigot oluşumundan sonraki olaylardan kaynaklanır. Cinsiyet kromozom mozaizmi en yaygın olanlarıdır. Bunlar: n/n-1 (XX/X veya XY/X), n-1/n+1(X/XXX veya X/XXY) şeklinde görülebilirler. İlk iki şekli, ilk zigot bölünmesi ile ortaya çıkarken üçüncüsü şekli daha sonra ortaya çıkar. Trizomi 21 mozaizmi orta derecede sıklıkta görülür. Kromozom 18, 13 ve 8 mozaizmleri, kromozom 21'den daha az görülürler. Diğer otozomal kromozom mozaisizmleri çok ender olarak görülürler⁽⁴⁴⁾.

Mozaizme benzeyen bir başka olgu da kimerizim'dir. Kimerizmin, mozaizmden farkı kromozom sayıları değişik hücrelerin, iki veya daha fazla zigottan kaynaklanmasıdır. Diğer bir ifadeyle, kişide birden fazla zigottan kaynaklanmış iki ya da daha çok genotipin ya da hücrenin bulunmasına kimerizm denir. Örneğin: ayrı cinsiyetten olan çift yumurta ikizlerinde doğumdan hemen sonra kromozom analizi yapılacak olursa, ikiz eşlerinden birinde hem XX hem de XY kromozomları içeren hücreler bulunabilecektir. Çünkü plasenta aracılığı ile bu ikizler arasında intraüterin kan transfüzyonu olabilmektedir. Aynı durum, doğum öncesi kan uyuşmazlığı sakıncalarını gidermek üzere yapılan kan nakillerinde de görülebilmektedir⁽⁴⁴⁾.

2)KROMOZOMLARIN ANAFAZDA GERİDE KALMASI: Anafazda geri kalma, aslında kromozom ayrılmasına benzer bir süreçtir. Normal olarak, kromozomların sentromerlerinden uzunlamasına ikiye ayrılıp kutuplara çekildikleri anafaz evresinde, bazen kromozomlardan biri geri kalır. Hareket etmekte geç kalan bu kromozom, ya eşinin (homolog) bulunduğu yavru hücreye katılır ya da bölünme sırasında ortadan kaybolur. Eğer eşinin bulunduğu hücre de kalacak olursa, bir hücrede kromozomdan bir yerine iki tane bulunurken, diğer hücrede o kromozomdan hiç bulunmayacağı için sonuç bakımından kromozom ayrılmamasına benzer bir durum ortaya çıkmış olacaktır. Eğer, sitoplazmanın bölünmesi sırasında kaybolacak olursa hücrelerden biri normal kromozom sayısına sahip olurken diğerinde bir kromozom eksik olacaktır⁽⁴³⁾.

2.5. GENETİK ANALİZ YÖNTEMLERİ

İnsan DNA'sının veya RNA'sının protein, metabolikler gibi ilgili ürünlerin; kalıtsal genotipi, mutasyonu, fenotipi ve karyotipi belirlemeye yönelik kullanılan yöntemlerdir⁽⁴⁵⁾.

2.5.1. Kromozomal analiz yöntemleri

2.5.1.1.CGH (comparative genomic hybridization): Bu teknik ile 23 kromozomun tamamını incelenmesine imkân sağlamaktadır. CGH genellikle 72 saatte sonuç verebilmektedir. Bunu yanı sıra CGH array ve microarray yöntemiyle 24 saatte sonuç alınmaktadır⁽⁴⁵⁾.

2.5.1.2.SNP (Single nuklotid polimorfizm): 23 kromozom çiftini analiz eden bir diğer tekniktir. Array CGH ve SNP yöntemleri yeni teknikler olup 23 kromozomun tamamını inceleme olanağı sağlamaktadır⁽⁴⁵⁾.

2.5.1.3.FISH (fluorescent in situ hybriditation): Sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerini bir araya getiren bir tekniktir. Genomda istenilen hedef DNA bölgesinin floresan veren DNA veya RNA problemleri ile boyanarak "in situ"

olarak gözlenmesine imkân tanıyan moleküler sitogenetik bir yöntemdir. İnterfaz hücre çekirdeğinin ve metafazdaki kromozomlarının değerlendirmesini sağlar. Yöntemin temelinde, görüntülenmesi hedeflenen DNA bölgesi komplementer florokromlar ile (floresans veren moleküller) işaretlenmiş olan tek iplikçikli (oligonukleotid) DNA dizileri kullanılır. Bu florokromlarla işaretlenen DNA dizilerine Prob denir. Morfolojik olarak korunmuş kromozom preparasyonlara, fikse edilmiş hücreler ya da doku kesitlerine uygulanabilmektedir⁽⁴⁵⁾.

Klinik sitogenetikte sayısal ve yapısal anormalliklerin, mikrodelsiyon sendromların, kriptik translokasyonların, marker kromozomların tanımlanmasında, tümör gelişiminde ortaya çıkan anormalliklerin tanımlanmasında, gen haritalamada kullanılan bir tekniktir⁽⁴⁵⁾.

FISH prosüdüğü genel olarak şu basamaklardan oluşur:

-Hedef DNA (metafaz kromozomu ya da interfaz nükleusu) ve prob hazırlanır⁽⁴⁵⁾.

-Hedef DNA ve prob birlikte ya da ayrı ayrı yüksek ısıda denatüre edilir.(72-75 C) DNA'nın çift zincirli yapısı açılarak tek zincirli hal alır⁽⁴⁵⁾.

-Hedef DNA ve prob 37C°'de hibridizasyonu sağlanır. (süre probun tipine göre değişir: 1-16 saat).Bu aşamada proplar hedef kromozom üzerindeki komplementeri oldukları bölgeye ya da bölgelere bağlanır⁽⁴⁵⁾.

-Hibridizasyon süresi bitince nonspesifik bağlanmalardan ve artefaktlardan (kirliliklerden) kurtulmak için çeşitli sıcaklıklarda ve çeşitli yoğunluklardaki tuz ve deterjan türevi maddelerle yıkama işlemi yapılır=Posthibridizasyon yıkama⁽⁴⁵⁾.

-Kromozomlar kontrast oluşturan bir renkle (örneğin; DAPI=4'-6-diamidino-2-phenylidole/ antifede) boyanarak görünür hale getirilir⁽⁴⁵⁾.

-Floresans mikroskopta incelenir⁽⁴⁵⁾.

-Hedef kromozom ya da kromozom bölgesine ve amaca bağılı olarak kullanılan çeşitli proplar vardır:

a-Tüm kromozom boyama proplar (kromozom painting prob) : Kromozom ya da kromozom kollarının identifikasyonu için kullanılan proplardır⁽⁴⁵⁾.

b-Sentromere özel proplar: Sentromer yakınındaki alfa satellit bölgesine özgü proplardır. Sadece 13/21 ve 14/22 kromozomları sentromerik bölgelerini homolog dizilere sahiptirler. Ayırt edilebilmeleri için ekstra bir prob ile kombine edilirler⁽⁴⁵⁾.

c-Lokus özel proplar=tek gen proplarıdır: Delesyon ya da duplikasyonları tespit etmek ve gen lokalizasyonunu belirlemek için kullanılan bir gen/lokus bölgesine özgü proplardır. Tümör genetiğinde sıklıkla kullanılır⁽⁴⁵⁾.

d-Telomerik proplar: Kromozomların terminal bölgelerini tanımlayan proplardır. Hücre yaşlanması (senescence), kromozomal yeniden düzenlenmeler ve delesyonların araştırılmasında kullanılır. Her kromozoma özgü telomerik proplar bulunmaktadır⁽⁴⁵⁾.

2.6. EMBRİYO BİYOPSİSİ

Hücre biyopsisi oosit ya da embriyolardan üç farklı aşamada yapılır.

1. Oosit/zigot (kutup cisim-polar body biopsisi)
2. 6/8 hücreli klivaj aşamasındaki embriyo (klivaj aşaması biyopsisi)
3. Blastokist aşamasındaki embriyo (blastokist biyopsisi)

2.6.1. Kutup cisim-Polar Body Biyopsisi

Polar body biyopsisi embriyo biyopsisindeki etik problemleri aşmak için geliştirilmiştir. Polar body biyopsisi ilk kez KF'in belirlenmesinde kullanılmıştır ancak krosing-over sebebiyle bazı olgularda ikinci polar body'ye

ihtiyaç duyulmuştur. Polar body biyopsisi eğer PGT için yapılacaksa mutlaka 1. ve 2. Polar body'de ihtiyaç vardır⁽⁴⁶⁾.

2.6.2. Klivaj Biyopsisi

Erken embriyo bölünme aşamalarında (4 hücre) biyopsi yapılması embriyo gelişimine zararlı olabilir. Bunun nedeni de iç hücre kitlesi trofektoderm oranını değiştirebilmektedir. Böylece embriyo biyopsisi için kullanılan başlıca strateji 3. günde 6-8 hücre aşamasındaki embriyoya biyopsi yapılmasıdır⁽⁴⁶⁾.

Klivaj aşamasında embriyo biyopsisinde bazı zorluklar çıkabilmektedir: İnsan embriyonik hücreleri son derece kırılgandır ve kolayca parçalanabilmektedir. Biyopsi işlemi sırasında böyle bir şey olursa çekirdek kaybolabilir ve başka bir hücre alınmak zorunda kalınır. 8 hücre ve morula aşamaları arasında kompaktlaşma olur ve kompaktlaşma süresince hücrelerarası interselüler etkileşimi arttırmak için birbirleri üzerine geçip ayırt edilemezler. Biyopsi böyle bir aşamada yapılıyorsa bitişik blastomerler arası güçlü bir bağ olduğundan blastomerin çıkarılması zordur. Kompaktlaşmış embriyodan hücrenin çıkarılmaya çalışılması hücrenin parçalanmasıyla sonuçlanabilmektedir. Zona pellusidanın dinamiğinin ve kalınlığının hastalar arası farklılık göstermesi, biyopsi işlemi süresince bazı problemlere neden olabilmektedir. Pek çok olguda çok sayıda sperm zona pelusida ile etkileşime girer ve bu yüzden PCR tekniğinde sperm kontaminasyon riskini azaltmak için ICSI tekniği uygulanmaktadır⁽⁴⁶⁾.

İnsanda IVF tedavi sikluslarında embriyo kriyoprezervasyon rutindir ve dondurulmuş embriyo transferi sikluslarında blastomerlerin %50'si hasarlanabilmektedir ve embriyoların halen canlı fetüs oluşturabilme potansiyeli vardır. Bazı hücrelerinin dondurma çözme ile hasarlandığı dondurulmuş embriyo transferini takiben fetal anormalliklerde artış olmadığı rapor edilmiştir. Embriyo biyopsisinin etkisini inceleyen çalışmalar

göstermiştir ki 8 hücre safhada 2 hücrenin alınması embriyo metabolizması veya gelişim için zararlı değildir ve embriyo canlılığının %90'nin üzerinde olduğu etkili bir işlemdir. ESHRE PGT konsorsiyumu'nun verilerine göre biyopsilerinin %97'si başarılıdır⁽⁴⁶⁾.

PGT sonrası biyopsi yapılmış embriyolardan elde edilen gebelikler üzerinde çalışılmıştır. Biyokimyasal ve ultrason ölçümleri, kontrol ve bu gebelikler arasında anlamlı gelişimsel farklılık bulunmadığını göstermiştir. Doğumlarda, bebek doğum ağırlıkları normal olarak belirlenmiştir⁽⁴⁶⁾.

2.6.3. Blastokist Biyopsisi

Blastokist biyopsisi 5. veya 6. günde yapılabilmektedir. Bu işlem fetüsün gelişeceği iç hücre kitlesini etkilemeden dış trofektodermin dış katmanına yapılmaktadır ve daha fazla sayıda hücre alınabilmesi sağlamaktadır. Bu durum analiz için bir avantajdır. Daha fazla hücrenin analiz edilmesi monogenetik hastalıkların tanısında faydalıdır. Ancak gebeliklerin en az %1'inde embriyonun kromozom durumunun plasentadan farklı olduğu, plasental mozaizm görüldüğünden, trofektoderim hücreleri (TE) genetik olarak iç hücre kitlesinden farklılaşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda blastokistin yüksek kromozomal mozaizmi olabileceğini göstermektedir. Blastokist biyopsisi sonrası vitrifikasyon işlemi tanı için daha fazla süre tanımaktadır⁽⁴⁶⁾.

Blastokist biyopsisi başlıca sınırlanması, az sayıda embriyonun blastokist aşamasına ulaşmasıdır. Kültür koşullarındaki gelişmelerle elde edilen blastokist sayısının artmasına rağmen PGT'nin başarılı olabilmesi ve transfer edilebilen normal embriyonun bulunabilmesi için yüksek sayıda embriyoya ihtiyaç vardır. Embriyolar blastokist aşamasına kadar kültüre edildiğinde durum böyle olmayabilir. Bu da yöntemin en önemli dezavantajıdır⁽⁴⁶⁾.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇ

Kullanılan Gereçler: Bu projede hassas terazi (Shimadzu®), otomatik pipetler (Eppendorf®), 37°C İnkübatör (Esco® miri multi room incubator, XQ1), CO2 inkübatörü (Thermo®), Azot tankı(MVE®), buzdolabı ve derin dondurucu (Panasonic®), santrifüj(Thermo®), ısı bloğu, İnvert Mikroskop (Leica®), sperm sayma kamarası (Makler®), , pH metre(Thermo®), Falcon® centre-well petrisi (Ref:353653), Falcon® 10 ml steril serolojik pipet (Ref:L161010), Falcon® 25 ml steril serolojik pipet (Ref:L161025), Falcon® 15 ml'lik steril tüpler (Ref: 14-959-15), Nunc™ steril 60 mm petri (Ref:150340), Falcon® 100 mm petrisine (Ref: 352006), Falcon® konik tabanlı 15 ml'lik tüpe (Ref:14-959-53A), Sunlight® denüstasyon pipeti (Ref:SDF130), Falcon® steril yuvarlak tabanlı 5ml tüpe (Ref:14-959-5), Sunlight® holding pipeti (Ref: SHP-70S-xx), ORIGIO® biyopsi pipeti (ref: MBB-FP-M-30), Thermo® Superfrost lam (Ref:4951PLUS4), Sunlight ICSI pipeti (Ref: SIC-45V-xx), ORIGIO® PİCSI petrisi (Ref: BCT-PİCSI-20), falcon® ICSI petrisi (Ref: 353655), Mikromanipilatör (TE300410709, Nikon®) ve laminer kabin(K-system®) kullanıldı.

Kimyasallar

BD® PBS (Fosfat tamponlu tuzlu su) (Ref:BA-257204.01) , Tween 20(Ref: p9416, Sigma®), 1N HCL (Ref: 193155, Sigma®).

Standart Solüsyonlar

ORİGİO® Flushing medium 10IU/ml heparin (Ref: 10765060), Sage® one step medium'la (Ref: 67010060A), Vitrolife® parafin oil (Ref: 10029), Lifeglobal® hiyalürünidaz (Ref: LGHY-010), Lifeglobal AllGrad® 90% (Ref: AG90-100), Lifeglobal AllGrad® 45%(Ref:AG45-100), Lifeglobal®

AllGrad Wash (Ref: GALW-100), Lifeglobal® clinical grade PVP (Ref: LPVP-001), Sage® quinn's advantage hepes (CaMg serbest) (ref:4100-12).

Çalışmaya alınan gruplar ve özellikleri

Bu çalışmada U.K.F.C.A tüp bebek merkezine 2015-2016 yılları arasında infertilite şikayetiyle başvuran hastalar üzerinde retrospektif olarak yapılmıştır. Bu çiftlerin erkek partnerlerinin Y kromozomuna bağlı anöploidi geçmişi bulunmaktadır. Çalışma toplam 27 hasta üzerinde yapılmıştır.

Çalışmada PCO ve endometriosis gibi faktörlü hastalar çalışma dışı bırakılmışlardır. Serum östradiol(e2) ve prolaktin düzeyleri normal olan 24-35 yaş arasındaki hastalara OPU (oosit pick up) işlemi yapılmıştır. Hastalardan ortalama 13 ve 34 oosit elde edilmiştir. Bu hastalardan elde edilen oositler, oosit denüdasyonu (oosit soyma) işlemi sonrasında 9 ile 26 arasında hasta başına değişmekle beraber metafaz II oosit elde edilmiştir. Toplam 471 oosit üzerinde çalışılmıştır. Hastalara embriyo transferleri blastosit gelişim gösteren ve FISH sonrası kromozom anöploidisi olmadığı bilenen embriyolar yapılmıştır.

Her bir hastadan elde edilen M2 matür oositler iki eşit grup şeklinde ayrılmıştır.

1.grup: 27 hastanın her birinden elde edilen M2 matür oositlerin yarısına gradyen yöntemiyle seçilmiş spermlemlerle ICSI yapıldı.

2.grup: 27 hastanın her birinden elde edilen M2 matür oositlerin yarısına PICSİ yöntemiyle seçilmiş spermlemlerle ICSI yapıldı.

3.2. KONTROLLÜ OVARYUM HİPERSTİMÜLASYONU

Normal bir kadında overlerde bulunan folüküller püberte döneminden sonra her mestural döngüde hormon etkisiyle 1 tanesi gelişir ve gelişen folükül içerisinde artan östradiol'un pozitif geri bildirim etkisiyle LH salgısını artırır ve folükül yırtılmasına neden olur. Yırtilan bölge de önce

korpus hemorejekum sonra ise korpus luteum oluşur. Yırtılan folükülden 1 adet oosit infundibulum yardımıyla tube uterinanın içerisine alınır. Tuba uterina içerisindeki oosit, döllenme gerçekleşmez ise uterusu geçer ve adet kanaması ile birlikte vajinadan dışarıya atılır.

Kontrollü ovaryum hiperstimulasyonda amaç birden fazla folükülün aynı anda geliştirilmesini sağlamaktır. Böylece OPU (Oocyte Pick-Up) ile çok sayıda oosit elde edilmesi sağlanmaktadır. (Resim 9)



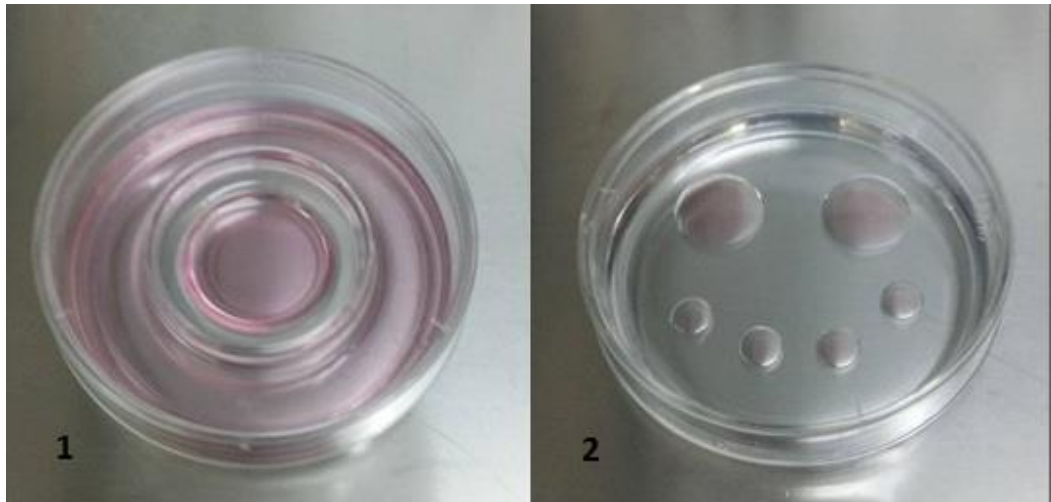
Resim 9: Kontrollü Hiperstimülasyonla geliştirilmiş folliküllerin ultrason altındaki görüntüsü. **(U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)**

27 hastaya kontrollü ovaryum hiperstimulasyon sağlamak amacıyla adetlerinin 2. gününde ultrasonografisi yapıldı ve kan östrodiol düzeyi bakıldıktan sonra yumurtalıkları uyarıcı iğne Follitropin BETA (Puregon®) başlandı. İğneler her gün aynı saatte subkutan olarak hastalara uygulandı. 3 günde bir hasta vajinal ultrasonografi yapılarak önde giden folüküller ölçüldü ve foliküllerin 13-14mm'ye ulaştığında veya kan östrojen seviyesi 600pg/ml'nin üstüne çıktığında Setroreliks (Cetrotide® 0.25 mg) subkutan olarak günde 1 kez yapıldı. Aralıklarla hastalara yapılan ultrasonografide hastaların folükülleri 22-23 mm geldiğinde hastalara HCG

(insan koryonik gonodotropin) (Pregnyl®) iğnesi uygulandı ve HCG iğnesinden 35 saat sonra hastalara OPU işlemi yapıldı.

3.3.OPU (Oocyte Pick-Up)

OPU işleminden bir gün önce embriyoloji laboratuvarında OPU işlem için gerekli hazırlıklar yapıldı. OPU işlemi sırasında gelecek olan yumurtaları toplamak için öncelikle toplama petrisi hazırlığı için Falcon® centre-well (Ref:353653) petrisi orta kısmına ve çevresinde ORİGİO® Flushing medium 10IU/ml heparinden (Ref: 10765060) Falcon® 10 ml steril serolojik pipet (Ref:L161010) yardımıyla ikişer ml kondu ve 37 C°'ye ayarlanmış etüve kaldırıldı. Fertilizasyon petrisi hazırlığı Nunc™ steril 60 mm petri (Ref:150340) içerisine Sage® one step mediumla (Ref: 67010060A) 500 µl 2 adet damla ve 40 µl 4 adet damla yapıldı ve damlaların üstü tamamen Vitrolife® parafin oil (Ref: 10029) ile Falcon® 25 ml steril serolojik pipet (Ref:L161025) yardımı ile kaplandıktan sonra %5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı. Kültür petrisi hazırlığı için Nunc™ 60 mm petriye Sage® one step medium ile 25 µl olacak şekilde 2 adet yıkama ve 8 adet kültür damlası yapıldı ve üzerleri 25 ml steril serolojik pipet yardımıyla Vitrolife® parafin oil ile tüm damlalar kapanacak şekilde kapladı ve %5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı. (Resim 10)



Resim 10: **1- Toplama Petrisi** (falcon® centre-well petrisi orta kısmına ve çevresinde ORİGİO® Flushing medium ile 10IU/ml heparin) **2- Fertilizasyon Petrisi** (Nunc™ steril 60 mm petri içerisine Sage® one step medium'la 500 µl 2 adet drop ve 40 µl 4 adet) **(U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)**

OPU işlemi yapılacağı gün hasta anestezi altına alındı ve hastalar vajinal ultrasonografi probu yardımıyla OPU iğnesi ile folüküllerin içleri aspire edildi ve Falcon® 15 ml'lik steril tüpler (Ref: 14-959-15) ile embriyoloji laboratuvarına getirildi ve tüpler Falcon® 100 ml petrisine (Ref: 352006) boşaltıldı. Laminar flow içerisinde bulunan stereo mikroskop altında steril cam pastör pipet ile granülosa ve kümülüs hücresi içeren oositler toplandı ve toplama petrisi olan center-well'in dış kısmına konuldu. OPU işlemi tamamlandıktan sonra toplanan oositler centre-well'in orta kısmında yıkandı. Yıkama işlemi tamamlanan oositler tekrar fertilizasyon petrisinin 500 µl damlaların birinde yıkandı ve sonra diğer 500 µl diğer damlaya kondu ve %5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı.

3.4. OOSİT DENÜDASYON

Dış hücre kitlesi ile beraber toplanan ve fertilizasyon petrisine kaldırılan oositler iki saat boyunca bu petri içerisinde bekletildi.

Denüdasyon, oositlerin çevresinde bulunan kümülüs hücrelerinin uzaklaştırılmasıdır. Bu işlem kimyasal ve fiziksel olarak iki aşamada yapılmamaktadır. Bu iki aşama ayrı ayrı değil aynı anda yapılan bir işlemdir. Bu işlem için oositlerin beklemesinin birinci saatinde Nunc™ 60mm petri içerisine ORİGİO® Flushing medium ile 10 IU/ml heparinden 300 µl büyük bir damla yapıldı bu damlanın içerisine 100 µl Lifeglobal® hiyalürünidaz (Ref:LGHY-010) eklenir. Bu damla kimyasal denüdasyon işlemi için kullanılır. Bu damlanın çevresine 40 µl olacak şekilde 4 adet yıkama ve fiziksel denüdasyon damlaları oluşturuldu. Petri üzerinde bulunan damlaların üzerleri tamamen Vitrolife® parafin oil ile Falcon® 25 ml steril serolojik pipet yardımı

ile kaplandıktan sonra 37° C'ye ayarlı etüve kaldırıldı ve bir saat kadar ısınması beklendi. (Resim 11)



Resim 11: Nunc™ 60mm petri içerisinde ORİGIO® Flushing medium ile 10 IU/ml heparin'den 300 µl büyük bir drop yapıldı bu dropun içerisinde 100 µl Lifeglobal® hyaluronidase çevresine 40 µl olacak şekilde 4 adet yıkama ve fiziksel denüstasyon dropları. **(U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)**

iki saatin dolmasından sonra steril cam pastör pipet yardımıyla fertilizasyon petrisinde bulunan dış hücre kitleli oositler denüstasyon petrisindeki kimyasal denüstasyon bölümüne kondu ve steril cam pastör pipet yardımıyla pipetlenerek hiyanülidaz enziminin etkisi ile oositlerin etrafını saran kümülüs hücrelerinin parçalanması sağlandı. Artık 2 veya 3 katlı korona radiata hücre katmanı ile kalan oosit petride bulunan diğer yıkama damlasına denüstasyon pipeti yardımıyla toplandı burada yıkanan oositler hiyanülidaz etkisinin dejeneratif etkisini azaltmak amacıyla diğer damlalara aktarıldı. Sunlight® denüstasyon pipeti (Ref:SDF130) ile pipetlenen oositlerin çevresinde bulunan son kat korona radiata hücreleride uzaklaştırıldı, böylece fiziksel denüstasyon işlemi de tamamlandı. Denüstasyon işlemi sonrasında yalnızca zona pellisuda kaplı oositler bırakıldı.

Zona pellisuda zarı ile kalan oositler 4 sınıf üzerinde ayrıldı. Bu sınıflardan 3 tanesi bölünme evresi 1 tanesi dış etkilerle ilgilidir. Oositler metafaz II, metafaz I, germikal vezükül ve dejenere olarak ayrıldı ve steril cam pastör pipet yardımıyla fertilizasyon petrisinin yıkama damlalarında yıkandı ve diğer droba aktarıldı ve %5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı.

3.5. KESİNTİLİ DANSİTE GRADYAN YÖNTEMİ (Gradient Yöntemi)

Kesintili dansite gradyanları; iyi kalitede spermlerin seçilmesini, spermlerin diğer hücre tipleri ve hücre döküntülerinden ayırt edilebilmesini sağlayabilir. Yüzdürme tekniğine göre standardize edilmesi daha kolay olduğu için, daha tutarlı sonuçlar vermektedir. IVF ve ICSI için sperm eldesi amacıyla bu teknik kullanılır.

Bu yöntem, dansite gradyanlarına göre seminal plazmanın santrifüjlenmesini kullanır. Bu yöntemde, koloidal silika kaplı silan içeren dansite gradyanları, hücreleri dansitelerine göre ayırır. Ayrıca, hareketli spermler yüzerek gradyan materyali içinden geçip tüpün dibinde yumuşak bir pellet oluşturur. En yaygın biçimde kullanılan basit iki aşamalı kesintili dansite gradyan hazırlama yöntemi, tipik olarak % 45 (v/v) dansiteli üst katman ve % 90 (v/v) dansiteli alt katmandan ibarettir. Dansite gradyanı santrifüjlemesi kullanarak hazırlanan sperm preparatları; genellikle hücre döküntüleri, kontamine edici lökositler, germ dışı hücreler ve dejeneratif germ hücrelerinden arınmış yüksek derecede hareketli spermlerin elde edilmesini sağlamaktadır.

Semenlerin işlenmesi için uygun dansite gradyanları hazırlamaya yönelik bir dizi ticari ürün mevcuttur. Bu ürünler üreticinin önerilerine göre kullanılmalıdır. Prosedüre ilişkin direktiflerden herhangi bir sapma kanıtlara dayanmalıdır. Dansite gradyan medyumlarının çoğu, yapısal olarak düşük osmolaliteye sahip göreceli yüksek moleküler kitleli bileşenleri

içerdiği için, genellikle kadın üreme yolu sıvılarıyla izozmotik bir kültür medyumunda hazırlanırlar.

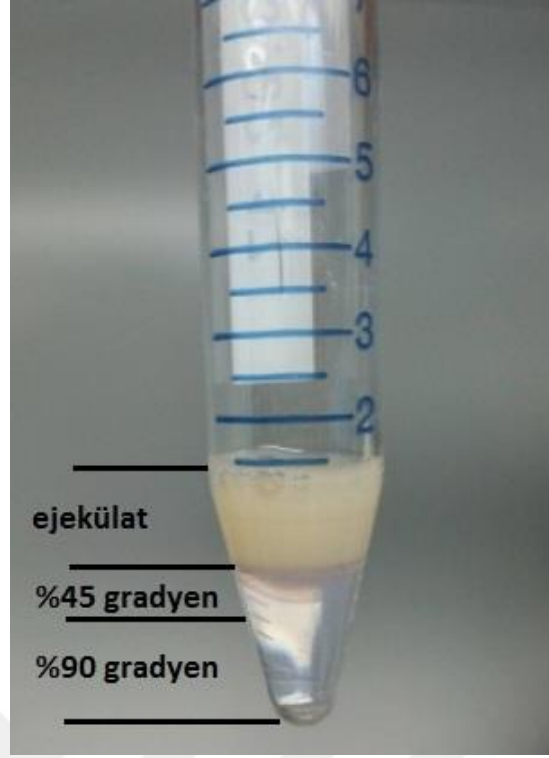
Hasta partnerlerine öncelikle semen analizinin verilmesi için bu amaçla hazırlanmış özel semen analizi odasına alındı. Bu oda uygun şekilde dizayn edilmiştir. Hasta partneri analizi vermesi için steril özel bir kap verildi bu kap hastanın yanında açıldı ve hastanın bilgileri kabın üzerine yazıldı ve hastaya teslim edilirken gerekli kurallar hastaya bildirildi.

Hastanın vermiş olduğu semen örneğinin bulunduğu kap androloji laboratuvarına gerekli evrakla birlikte teslim edildi.

Teslim edilen semen örneği tipik olarak yarı katı koagüle kitle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde genellikle likefiye olmaya (incelmeye) başlar. Bu sırada sıvı içinde heterojen topaklardan oluşan karışım görülecektir. Likefaksiyon devam ederken semen daha homojen ve hemen hemen su gibi bir hale gelir. Son evrelerde yalnızca küçük koagülasyon alanları kalır. Numunenin tümü oda sıcaklığında genellikle 15 dakika içinde likefiye olur, bu durum nadiren 60 dakika veya daha uzun zaman alabilir.

Likefiye olan semen öncelikle makroskopik açıdan incelendi. Burada semen kokusu, rengi ve volumüne bakıldı.

Makroskopik inceleme sonrasında semen analizi mikroskopik olarak incelenir. Burada Makler® Sperm Sayma Kamerasına 10 µl semen örneği damlatıldı ve ışık mikroskopunda 20'lik büyütme ile kamara üzerinde bulunan kareler sağdan sola doğru 10 tanesi üzerine de bulunan hareketli ve hareketsiz tüm spermeler sayıldı. Çıkan sayı milyon ile çarpıldı böylece semen örneğinin 1 ml içerisindeki toplam sayısı bulunur. Bulunan sayı ile aynı karelerdeki hareketsiz spermeler ayrı olarak sayıldı ve hareketli spermelerle orantılanarak hareketlilik yüzde olarak belirlendi⁽²²⁾.



Resim 12: Falcon® konik tabanlı tüp içerisinde 0,5 ml ejakülat, 0,5 ml %45 gradyen, %90 gradyen **(U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)**

Makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen semen kesintili dansite gradyen ile hazırlamak için steril Falcon® konik tabanlı 15 ml'lik tüpe (Ref:14-959-53A) Falcon® 10 ml steril serolojik pipet ile önce Lifeglobal AllGrad® 90% (Ref: AG90-100) 1ml olacak şekilde tabana kondu. Bunu üzerine tüp 45° tutularak ve iki katman karışmayacak şekilde Falcon® 10 ml steril serolojik pipet yardımı ile Lifeglobal AllGrad® 45%(Ref:AG45-100) 1 ml olacak şekilde ikinci kat olacak şekilde konik tüpün içine eklendi. Konik tüpün üzerine yine 45° tutularak Falcon® 10 ml steril serolojik pipet ile köpürtülmeden karıştırılmış semen örneği 1 veya 2 ml olacak şekilde tüpün üzerine eklendi. Böylece konik tüp içerisinde 3 kat şeklinde bir yapı oluştu. Bu tüp dengeleyici tüple beraber santrifüje kondu ve 15-20 dk 300-400 g'de santrifüjlendi. (Resim 12)

37 C° etüvde bekletilen Lifeglobal® AllGrad Wash (Ref:GALW-100) Falcon® steril yuvarlak tabanlı 5ml tüpe (Ref:14-959-5) Falcon® 10 ml

steril serolojik pipet ile 3 ml olacak şekilde medium eklendi. Santirifuj işlemi biten semen örneği 3 ml'lik steril cam pastör pipet yardımıyla diğer katmanlardan bulunan vasatı çekmeden dikkatli bir şekilde konik tüpün tabanında toplanan pellet alındı ve Lifeglobal® AllGrad Wash içeren Falcon® steril yuvarlak tabanlı 5 ml'lik tüpün içerisine karıştırılarak kondu.

Hazırlanan yeni tüp amacı pelet içerisinde bulunan ve spermatozoon'ları silika kaplı silanlardan temizlemektir. Hazırlanan tüp 5-7 dk 200-300 g'de santrüfüje edildi. Santrüfüj işlemi sonrasında tüp içerisindeki üst vasat serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Böylece semen ICSI işlemi için hazır hale geldi.

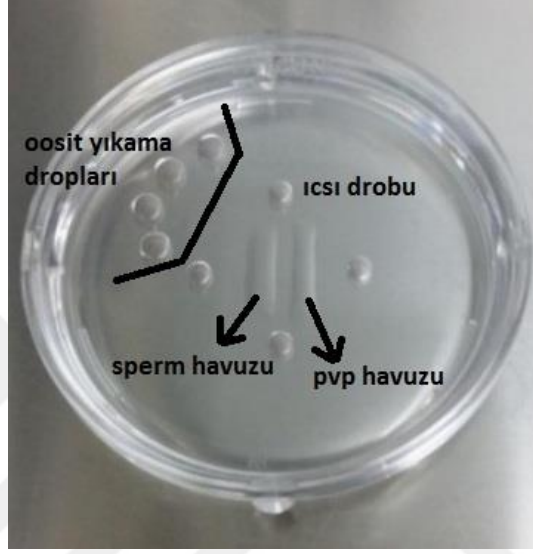
3.6. GRADYEN İLE SEÇİLMİŞ SPERMLER İLE ICSI

Denüstasyon işleminden iki saat sonra ICSI işlemi yapılır. ICSI işlemi metafaz II evresindeki oositlere iğne yardımıyla sperm enjekte edilmesi işlemidir.

Denüstasyon işleminin bir saat sonrasında falcon® ICSI petrisi (Ref: 353655) hazırlığı yapıldı. Falcon® ICSI petrisine ORİGİO® Flushing medium ile 10 IU/ml heparinden 5 µl 4 adet ICSI damlacığı 10 µl 4 adet yıkama damlası ve 1 adet 15 µl sperm havuzu hazırlandı. Aynı petri üzerine Lifeglobal® clinical grade PVP (Ref:LPVP-001) ICSI mediumundan 3 µl PVP havuz yapıldı ve üzerlerine tamamen Vitrolife® parafin oil ile 10 ml steril serolojik pipet yardımı ile kaplandıktan sonra 37 C°'ye ayarlı etüve kaldırıldı ve bir saat kadar ısınması beklendi. PVP (Polyvinylpyrrolidone) sperm hareketi yavaşlatmaya ve rahat işlem yapmaya olanak sağlar. (Resim 13)

Denüstasyon işleminden iki saat sonra Nikon® invert mikroskop manüplütör hazırlandı. Manüplütöre Sunlight holding pipeti (Ref: SHP-70S-xx) ve ICSI pipeti (Ref: SIC-45V-xx) takıldı.

Steril cam pastör pipet yardımıyla fertilizasyon petrisinde bulunan metafaz II evresindeki (matür) oositler ICSI petrisinde yıkama damlasında yıkandı ve ICSI damlalarına dağıtıldı. ICSI petrisinin androloji laboratuvarında hazırlanan spermlerden steril cam pastör pipet ile 2 µl alındı ve sperm havuzuna kondu. ICSI petrisi hazırlanan manüplatörün üzerine yerleştirildi.



Resim 13: ICSI petrisi (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

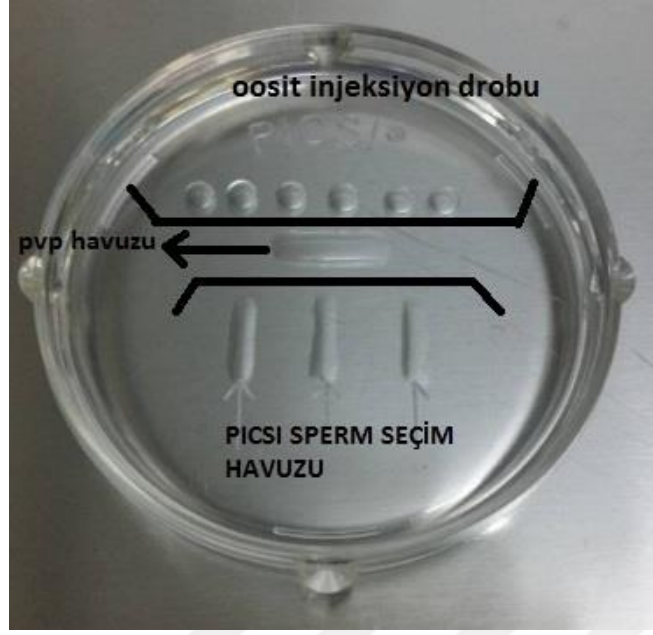
ICSI iğnesi ile sperm havuzundan normal morfoloji ve harekete sahip spermier seçildi. Seçilen spermier PVP havuzuna kondu. Burada spermier boyun ve baş kısmına dokundan kuyruk böylesi ile boyun bölgesinin arasına ICSI iğnesi ile sürme hareketi yapılarak spermier hareketsizliği ve karakteristik Z görünümü sağlandı. Bu işlemin yapıliş nedeni spermierin akrozom reaksiyonun başlamasını sağlamaktır. Hareketsizliği sağlanan spermier ICSI iğnesinin içine tek tek çekildi ve ICSI damlasında bulunan metafaz II evresindeki oositlerin yanına gelindi. Holding pipeti yardımıyla oositler tutuldu ve metafaz II evresindeki oositlerin karakteristik polar body mikroskop altında ICSI iğnesi yardımıyla saat 12 veya 6 yönünde ayarlandı bunun amacı oositlerin polar body bölgesine yakın kısımlarında iğ ipliklerinin varlığıdır. ICSI iğnesinin bunlara zarar vermesini önlemek için bu işlem

yapılır. Ayarlanan oositler holding pipeti ile sabitlendi. ICSI iğnesinin içerisinde bulunan sperm iğnenin uç kısmına getirildi ve oositin tam orta kısımdan ICSI iğnesi ile girildi ve oositin orta noktasına kadar ilerlendi ve yavaşça oositin sitoplazmasından oositte karakteristik dalgalanma görülene kadar yavaşça ICSI iğnesinin içine çekildi. Sitoplazmanın ICSI iğnesi içine çekilmesindeki amaç oositin metafaz evresinin tamamlama uyarısında bulunmak ve Ca⁺⁺ reaksiyonun başlamasını sağlamaktır. İçeri çekilen sitoplazma ile sperm oositin içine bırakıldı ve ICSI iğnesi oositin içinde çıkarıldı. Bu işlem metafaz II evresindeki oositlerin tamamına uygulandı. ICSI işlemi sonrasında steril cam pastör pipet yardımıyla oositler bir gün önceden hazırlanan kültür petrisinin yıkama damlasında yıkandı ve petrinin diğer damlalarına tek tek dağıtıldı. Oosit içeren kültür petrisi %5 CO₂ ve %6 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO[®] miri benchtop inkübatörüne konuldu

3.7. PİCSI İLE SEÇİLMİŞ SPERMLER İLE İCSI

Denüstasyon işleminden iki saat sonra PİCSI ile seçilmiş spermiler ile İCSI işlemi yapılır. İCSI işlemi metafaz II evresindeki oositlere spermilerin iğne yardımıyla sperm enjekte edilmesi işlemidir.

Denüstasyon işleminin bir saat sonrasında ORIGIO[®] PİCSI petrisi (Ref: BCT-PİCSI-20) hazırlığı yapıldı. ORIGIO[®] PİCSI petrisine ORIGIO[®] Flushing medium 10IU/ml heparinden 5 µl 6 adet İCSI ve oosit yıkama damlası yapıldı. PİCSI petri üzerinde bulunan 3 adet ok hizasına 5 µl ORIGIO[®] Flushing medium 10IU/ml heparin ile sperm havuzu yapıldı. Aynı petri üzerine Lifeglobal[®] clinical grade PVP İCSI mediumdan 6 µl PVP havuz yapıldı ve üzerlerine tamamen Vitrolife[®] parafin oil ile 10 ml steril serolojik pipet yardımı ile kaplandıktan sonra 37 C°'ye ayarlı etüve kaldırıldı ve bir saat kadar ısınması beklendi.(Resim 14)



Resim 14: PICSI petrisi (U.K.F.C.A tüp bebek kayıtlarından alınmıştır.)

PICSI petrisi üzerinde bulunan okların uç kısmında PICSI petrisine özel olan ve spermlerin bağlanmasını sağlayan hiyanülüdaz bölgesi bulunmaktadır.

Denüdasyon işleminin iki saat sonrasında Nikon® manüplator hazırlandı ve manüplatöre Sunlight® holding pipeti ve ICSI pipeti takıldı.

Steril cam pastör pipet yardımıyla fertilizasyon petrisinde bulunan metafaz II evresindeki (matür) oositler PICSI petrisinde yıkama damlacığında yıkandı ve ICSI damlacıklarına dağıtıldı. Androloji laboratuvarında hazırlanan sperminden steril cam pastör pipet ile 2 µl alındı ve PICSI petrisinde bulunan 3 adet sperm havuzuna kondu. PICSI petrisi hazırlanan invert mikroskop üzerine yerleştirildi.

ICSI iğnesi ile sperm havuzundan normal morfoloji ve bağlanma bölgesine bağlanmış spermler seçildi. Seçilen spermler PVP havuzuna konur. Burada spermin boyun ve baş kısmına dokundan kuyruk böylesi ile boyun bölgesinin arasına ICSI iğnesi ile sürme hareketi yapılarak spermin hareketsizliği ve karakteristik Z görünümü sağlandı. Hareketsizliği sağlanan

spermier ICSI iğnesinin içine tek tek çekildi ve ICSI damlacığında bulunan metafaz II evresindeki oositlerin yanına gelindi. Holding pipeti yardımıyla oositler tutuldu ve metafaz II evresindeki oositlerin karakteristik polar body mikroskop altında ICSI iğnesi yardımıyla saat 12 veya 6 yönünde ayarlandı. Ayarlanan oositler holding pipeti ile sabit tutulur. ICSI iğnesinin içerisinde bulunan sperm iğnenin uç kısmına getirildi ve iğne ile oositin tam olarak orta kısımdan içine girilirdi ve oositin orta noktasına kadar ilerlendi ve yavaşça oositin sitoplazmasında oositte karakteristik dalgalanma görölene kadar ICSI iğnesinin içine çekildi. ICSI iğnesi içine çekilen sitoplazma ile sperm oositin içine bırakılırdı ve ICSI iğnesi oositin içinde çıkarıldı. Bu işleml metafaz II evresindeki oositlerin tamamına uygulandı. ICSI işleml sonrasında steril cam pastör pipet yardımıyla oositler bir gün önceden hazırlanan kùltür petrisinin yıkama damlacığında yıkandı ve petrinin diğer damlacıklarına tek tek dağıtıldı. Oosit içeren kùltür petrisi %5 CO₂ ve %6 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO[®] miri benchtop inkùbatörüne konuldu.

3.8. EMBRİYO GELİŞİMİ

Oositlere ICSI işlemlinin yapıldığı gün 0. Gün olarak kabul edilir. Oositlerin fertilizasyon durumları 1. günde incelenir ve bu inceleme ICSI işlemlinden 16-18 saat sonra yapılır. Embriyolar 5 gün boyunca takip altında tutulur. 5. gün ya transfer yapılır veya vitrifikasyon yöntemiyle dondurulur. Embriyolar bu dönemlerde farklı isimler alırlar. Farklı isimler almasıyla beraber 5 günlük süre boyunca embriyo morfolojik değişimlerle beraber gelişim gösterir. Saat bazında incelediğinde ICSI işleml 0. saat olarak kabul edilir ve 120 saat sürer. 0-4 saatleri arasında fertilizasyon 4-10 saatleri arasında DNA sentezi ve DNA yeniden programlanması 30-72 saatleri arasında genom aktivasyonu 72-120 saatleri arasında ise transkripsiyon, kompaksiyon, ekspansiyon ve farklılaşma başlar⁽³⁹⁾.

3.8.1. Birinci Gün Embriyo Değerlendirme

Erken embriyoların değerlendirilmesinde morfolojik olarak sınıflandırma gözlem yoluyla mikroskoplarda oda ısısı koşullarında yapılır. Bunu için birinci gün pronükleus (PN) varlığı ve 2. Kutup cismi gözlenir. Pronükleus sperm ve oosit nükleuslarının gözlenmesidir ve ideal olarak 1.günde 2 adet pronukleus gözlenir. 2. Kutup cismi metafaz II. evresinin tamamlanmasıyla az bir sitoplazma ile beraber previtellin aralığa küçük bir yapı atılmasıdır ve ideal olarak 2 adet kutup cismi gözlenir.

ICSI işleminin yapıldığı gün 1.gün için embriyo gelişiminin 2. gününde de 3. gün için kültür petrisi hazırlandı. Kontrol edilen embriyolar 1. gün ve 3. gün birer gün önce hazırlanan petrilere aktarma yapılarak değiştirildi.

Kültür petrisi hazırlığı için Nunc™ 60 mm petriye Sage® one step mediumla 25 µl olacak şekilde 2 adet yıkama ve 15 adet kültür damalcığı yapıldı ve üzerleri 10 ml steril serolojik pipet yardımıyla Vitrolife® parafin oil ile tüm damlacıklar kapanacak şekilde kapladı ve %6 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlı inkübatöre kaldırıldı.

1.gün embriyolar ICSI'den 16-18 saat sonra sıcak zeminli invert mikroskopta tek tek kontrol edildi.

PN ve 2. Kutup cismi bulunan embriyolar belirlendi. Belirlenen embriyolar steril cam pastör pipet yardımıyla bir gün önceden hazırlanan kültür petrisine aktarıldı.

Aktarma işleminde yıkama damlalarında embriyolar yıkandı ve diğer damlalara tek tek dağıtıldı.

Embriyo içeren kültür petrisi %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO® benchtop inkübatörüne konulur.

3.8.2. İkinci Gün Embriyo Değerlendirme

2. ve 3. günde embriyoların blastomer sayısı, blastomerlerde nükleus varlığı, embriyoda fragmantasyon varlığı ve yüzde olarak derecesi, blastomerlerin bölünmesinin simetrikliği ve blastomerlerin sitoplazmasının renk tonu olarak değerlendirilir. Bu değerlendirme kısaltmalar kullanılarak yapılır.

2.gün embriyolar sıcak zeminli invert mikroskopta tek tek kontrol edildi ve embriyoların ilk klivaj (bölünme) gözlemlendi.

Embriyolarda blastomer sayısı, blastomerlerde nükleus varlığı, embriyoda fragmantasyon varlığı ve yüzde olarak derecesi, blastomer bölünmesini simetrikliği ve blastomer sitoplazmasının renk tonu olarak değerlendirildi.

Petri aktarması yapılmadan aynı petri %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO® benchtop inkübatörüne konuldu.

3.8.3. Üçüncü Gün Embriyo Değerlendirme

3.gün embriyolar sıcak zeminli invert mikroskopta tek tek kontrol edildi ve embriyolar blastomer sayısı, blastomerlerde nucleus varlığı, fragmantasyon varlığı ve yüzde olarak derecesi, blastomer bölünmesinin simetrikliği ve blastomer sitoplazma renk tonu olarak değerlendirildi.

Değerlendirilen embriyolar yerlerini aynı kalacak şekilde steril cam pastör pipet yardımıyla bir gün önceden hazırlanan kültür petrisine aktarıldı. Aktarma işleminde yıkama damlacıklarında embriyolar yıkandı ve diğer damlalara tek tek dağıtıldı.

Embriyo içeren kültür petrisi %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO® benchtop inkübatörüne konuldu.

3.8.4. Beşinci Gün Embriyo Değerlendirmesi

Blastokist sınıflandırması ICM (iç hücre kitlesi), embriyo içi kavite ve kaviteyi saran trofektoderm hücrelerinin değerlendirilmesini kapsar.

Buna göre blastokist gelişimi ve görünüm 1'den 6'ya kadar farklı sayılarla numaralandırılır. 1 blastokistin kavitesi embriyonun toplam görüntünün yarısında az olduğunda 2 blastokistin kavitesinin embriyonun toplam görüntüsünün yarısından fazla olduğunda 3 embriyonun içinin kaviteyle kaplı olduğunda 4 kavite genişlemesiyle zonanın ince bir yapı alması 5 ve 6 embriyonun hatch (zonadan embriyonun kurtulması) yapmasına göre sınıflandırılır⁽³²⁾.

İç hücre kitlesinin sınıflandırmasında A, B ve C harfleri kullanılır. Buna göre: A çok sayıda iç hücre kitlesi sıkı bir şekilde paketlenmiştir. B iç hücre kitlesi gevşek şekilde gruplanır. C iç hücre kitlesi çok az olarak gözlenir⁽³²⁾.

Trofektoderm hücrelerinin sınıflandırmasında A, B ve C harfleri kullanılır. Buna göre: A trofektoderm hücrelerinin birçoğu uyumlu bir tabaka oluştururlar. B trofektoderm hücreleri az bir kısmı epitelyal bir görünüme sahiptir. C trofektoderm hücreleri büyük ve az sayıdadır⁽³²⁾.

5. gün sıcak zeminli invert mikroskopta embriyolar tek tek kontrol edildi ve blastokist aşamasına gelmeyi başaran embriyolar ICM kalitesi, blastokist gelişimi ve trofektoderm durumuna göre değerlendirildi.

Blastokist aşamasına gelen embriyolar embriyo biyopsisi için tekrar %6 CO₂ ve %5 O₂ gazları ile ayarlanmış ESCO® benchtop inkübatörüne konuldu.

3.9. TROFEKTODERM BİYOPSİSİ

FALCON® ICSI petrisi üzerine Sage® quinn's advantage hepesten (CaMg serbest) (ref:4100-12) 5 µl olacak şekilde blastokist sayısı

kadar damlacık oluşturuldu. Sonrasında bu damalcıkların üzeri 10 ml steril serolojik pipet yardımıyla Lifeglobal® parafin oil ile kaplandı. Hazırlanan bu petriye biopsi petrisi denir. Biyopsi petrisi 37 C° ısıya ayarlanmış etüve kaldırılarak ısınması için bir saat beklendi.

blastokist biyopsisi öncesi mikromanipilatörün sağ koluna ORIGIO® biyopsi pipeti (ref: MBB-FP-M-30) sol koluna ise ORGIO® holding pipeti takıldı. Bir saat beklemeden sonra cam pastör pipet yardımıyla kültür petrisinden önceden belirlenen embriyolar alındı ve biyopsi petrisinde bulunan damlacıklara tek tek yerleştirildi.

Biopsi petrisi embriyolar ile birlikte sıcak zeminli invert mikroskop yerleştirildi. İnvrt mikroskopta bulunan lazer objektif (HAMILTON THORNE ZILOS-tk) ile embriyoların zonalarına delik açıldı ve açılan bu delikten her bir embriyodan çekirdeği gözlenen trofektoderm hücreleri biyopsi pipeti yardımıyla ICM'e (iç hücre kitlesi) zarar vermeden çıkarıldı ve her bir trofektoderm hücresi kendi bulunduğu embriyonun yanında bırakılır. Biyopsi işleminden sonra biyopsi petrisinde bulunan embriyolar sıcak zeminli sterio mikroskop altında kültür petrisine numaralandırılarak steril cam pastör pipet yardımıyla aktarıldı. Biyopsi petrisinde bulunan numaralı damlacıklarda her bir blastokistin trofektoderm parçası fiksasyon için hazırlandı.

3.9.1. Trofektoderm Fiksasyonu

Öncelikle cam kalemiyle fiksasyon için Thermo® Superfrost lam (Ref:4951PLUS4) çizildi ve numaralandırıldı. Biyopsi petrisinde, trofektoderm parçalarının bulunduğu damlacıkların mediumu numara sırasıyla BD® PBS (Fosfat tamponlu tuzlu su) (Ref:BA-257204.01) ile değiştirildi. PBS'in içinde bulunan trofektoderm parçaları lam üzerindeki numaralarına uygun sırayla spreading solüsyonu yardımı ve steril cam pastör pipet kullanılarak hipotonik olarak patlatıldı ve çekirdeğinin fikse edilmesi sağlandı. Bu işlem soğuk zeminde sterio mikroskop altında yapıldı. Lam üzerine fikse edilmiş

trofektoderm çekirdeklerinin görünümüne göre kağıt üzerinde belirtildi. Fiksasyonun son aşaması olarak üzerinde trofektoderm çekirdeği bulunan lam sırayla beş dakika PBS ve ikişer dakika %70, %85 ve %100'lük alkolde bekletildi. Sonra lam kurutulup çekirdekler invert mikroskopta tekrardan kontrol edildi ve FISH analizi için Genetik Laboratuvarına gönderildi.

4-BULGULAR

Bu çalışma toplam 27 hasta üzerinde yapıldı. Bu hastaların yaş ortalaması $29,2 \pm 3,1$ (Range:23-34) olan hastalardan toplam 588 yumurta elde edildi. Bunlardan 471 adet oosit m2 (metafaz 2) aşamasında matür oositir bunların 236 adedi'ne gradiyen yöntemiyle seçilen spermlelerle ICSI, 235 adedi'ne ise PICSI yöntemiyle seçilmiş spermlelerle ICSI işlemi yapılmıştır.

27 hastanın toplam oositleri ortalaması $21,8 \pm 5,0$ ($\mu \pm \sigma$), m2 (metafaz 2) matür oositleri $17,4 \pm 3,9$ ($\mu \pm \sigma$), m1 (metafaz 1) oositler $1,7 \pm 1,8$ ($\mu \pm \sigma$), gv (germial vezikül) oositler $1,7 \pm 1,4$ ($\mu \pm \sigma$), dj (dejenere) oositler $0,5 \pm 0,9$ ($\mu \pm \sigma$) olarak değerlendirildi. Bu hastaların %37'sinde m1 (metafaz 1) (10 hasta) %30'unda gv (germinal vezikül) (8 hasta), %74'ünde dj (dejenere) (20 hasta) oosit bulunmamaktadır.(Tablo 2)

Tablo 2: Çalışma grubu hastalarının oosit dağılımı ortalama durumları M2 (metafaz 2), M1 (metafaz 1), GV (germial vezikül), DJ (dejenere) oositlerdir.

OOSİT BİLGİLERİ	$\mu \pm \sigma$
Toplam oosit	$21,8 \pm 5,0$
M2	$17,4 \pm 3,9$
M1	$1,7 \pm 1,8$
GV	$1,7 \pm 1,4$
DJ	$0,5 \pm 0,9$

Çalışma grubundaki 27 hastanın eşlerinden 3-7 gün arası cinsel pehriz sonrası sperm örneği alınmıştır Alınan spermlerin bazal değerleri sperm volumü $2,2\pm 0,8$ ($\mu\pm\sigma$), sperm sayısı $54,1\pm 32,4$ ($\mu\pm\sigma$) ml/sayı (milyon), sperm motilitesi $50,4\pm 12,4$ ($\mu\pm\sigma$) (%), sperm morfolojisi $7,1\pm 1,1$ ($\mu\pm\sigma$) (%) ortalama değerleri gözlenmiştir. Bu değerler WHO (dünya sağlık örgütü) 2010 yılı semen analizi değerleri için normal olarak değerlendirilmektedir⁽²⁰⁾. (Tablo 3)

Tablo 3: Çalışma grubundaki hastaların eşinde elde edilen sperm örneklerinin bazal ve gradyen ile yıkama sonrası ortalama değerleri.

SPERM ÖZELLİKLERİ	$\mu\pm\sigma$ (BAZAL)	$\mu\pm\sigma$ (YIKAMA SONRASI)
ml/sayı (milyon)	$54,1\pm 32,4$	$21,9\pm 11,2$
Motilite	$50,4\pm 12,4$	$77,6\pm 9,3$
Morfoloji	$7,1\pm 1,1$	$12,8\pm 2,2$
Volüm	$2,2\pm 0,8$	

Çalışma grubundaki hastaların eşlerinden elde edilen sperm örneklerinin tamamı gradyen sperm yıkama yöntemiyle yıkanmış ve hazırlanmıştır. Spermleri yıkama sonrası ortalama değerleri sperm sayısı $21,9\pm 11,2$ ($\mu\pm\sigma$) ml/sayı (milyon), sperm motilitesi $77,6\pm 9,3$ ($\mu\pm\sigma$) (%), sperm morfolojisi $12,8\pm 2,2$ ($\mu\pm\sigma$) (%) değerleri gözlenmiştir. (Tablo 3)

Hastalardan OPU (oosit pick up) sonrası toplam 471 adet M2 (metafaz2) ile işlem yapılmıştır. Her hastadan elde edilen matür oosit iki grup olarak çalışılmış ve hasta başına matür oositler eşit olarak gradyen ile seçilmiş spermlerle ICSI ve PICSİ yöntemiyle seçilmiş spermler ile ICSI

yapılmışlardır. Bu işlem sonrası embriyolar 5 gün boyunca zigot gelişimi takip edilmiştir. 1. gün ICSI işlemlerinde yaklaşık 16-18 saat sonra oositlerin iki pronukleus (2PN) kontrolü yapılmıştır. Gradyen ile seçilen spermle yapılan ICSI'den 83.0%'de 2 PN gözlenirken PICSİ ile seçilen spermle 88.9%'da 2PN gözlenmiştir. Bu doğrultuda $p=0.003$ değeri ortaya çıkmıştır. İki çalışma grubunda anlamlı bir fark görülmüştür. (Tablo 4)

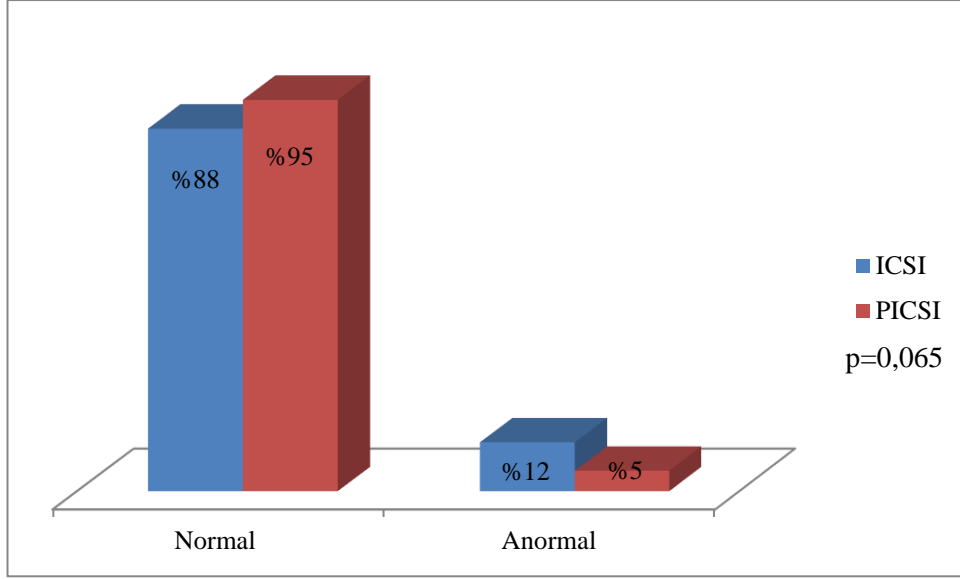
İkinci gün embriyo değerlendirmesinde embriyoların hücre bölünmesi, blastomerlerde çekirdek varlığı, fragmentasyon oranı ve blastomerlerin renk görünümü dikkate alınmıştır. Buna göre ikinci gün için gradyen yöntemiyle seçilmiş spermle yapılan ICSI ve PICSİ yöntemiyle seçilmiş spermle yapılan ICSI'den elde edilen embriyolarda hücre sayısı 4 hücre ve üstü olarak $p=0,346$, blastomerlerde çekirdek gözlenme $p= 0,100$, embriyo içinde fragmentasyon $p=0,717$ ve blastomerlerin parlaklık görünümü $p=0,297$ olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda ikinci günde embriyo değerlendirmesi gelişimi arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. (Tablo 4)

Üçüncü gün embriyo değerlendirmesinde de ikinci günde embriyo değerlendirmesindeki parametreler dikkate alınmıştır. Buna göre üçüncü gün embriyo gelişimi için gradyen yöntemiyle seçilmiş spermle yapılan ICSI ve PICSİ yöntemiyle seçilmiş spermle yapılan ICSI işleminden elde edilen embriyolarda hücre sayısı 8 hücre ve üstü olarak $p=0,383$, blastomerlerde çekirdek gözlenme $p= 0,341$, embriyo içinde fragmentasyon $p=0,487$ ve blastomerlerin parlaklık görünümü $p=0,932$ olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda üçüncü günde embriyo değerlendirmesi gelişimi arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. (Tablo 4)

Tablo 4: Çalışma grubunda bulunan hastaların birinci gün embriyo dölleme ve ikinci, üçüncü gün embriyo gelişimlerinin parametrelerinin yüzdelik değerleri: ki-kare ve p değerleri.

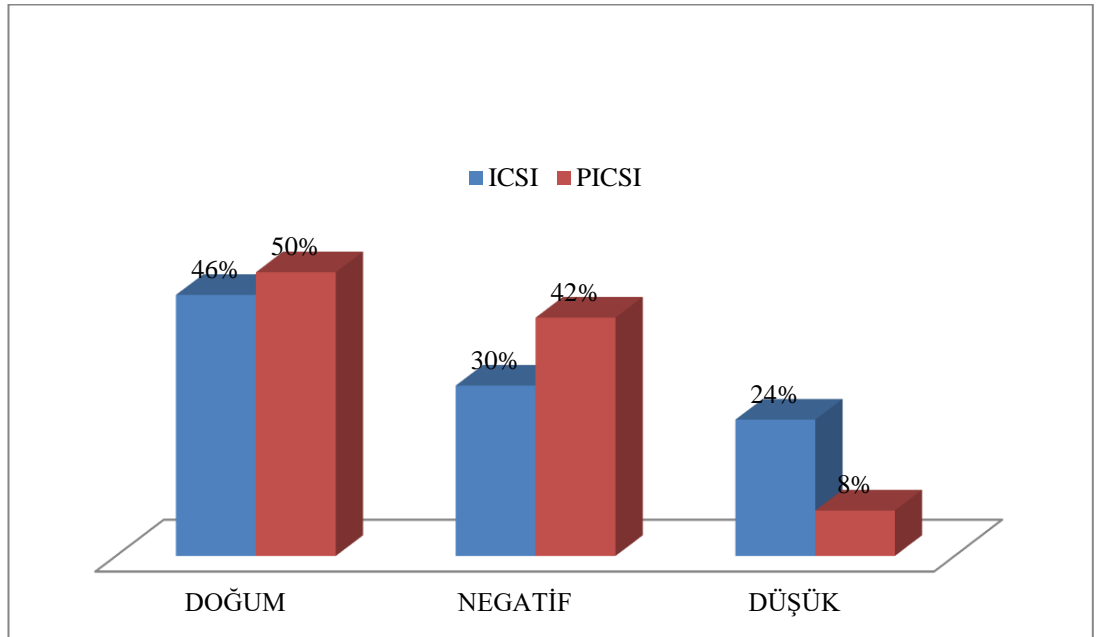
EMBRİYO GÜNÜ	EMBRİYO DEĞERLENDİRME	ICSI	PICSI	Chi-Square	p
1. gün	2PN	83,0%	88,9%	11,37	0,003
	FF+DJ	17,0%	11,1%		
2. gün	Hücre sayısı >=4	75,9%	71,8%	0,88	0,346
	Hücre sayısı<4	24,1%	28,2%		
3. gün	Hücre sayısı >=8	54,0%	58,3%	0,76	0,383
	Hücre sayısı<8	46,0%	41,7%		
2. gün	Çekirdek yok	28,0%	30,7%	4,59	0,100
	Tek çekirdek	69,9%	69,3%		
3. gün	Çekirdek yok	28,9%	24,6%	0,89	0,341
	Tek çekirdek	71,1%	75,4%		
2. gün	Fragmantasyon: 0	84,9%	87,1%	0,66	0,717
	Fragmantasyon >20	15,1%	12,9%		
3. gün	Fragmantasyon:0	85,1%	82,4%	1,44	0,487
	Fragmantasyon >20	14,9%	17,6%		
2. gün	Açık renk	99,5%	100,0%	1,09	0,297
	Koyu renk	0,5%	0,0%		
3. gün	Açık renk	99,4%	99,5%	0,07	0,932
	Koyu renk	0,6%	0,5%		

Hastaların embriyo gelişimleri beşinci günde blastokist değerlendirmesi yapıldı. Toplam 471 matür oosite yapılan işlem sonrasında bunlardan 226 tanesi beşinci gün trofektoderm biyopsisi için uygun blastokisti. 236 adet oosit gradyen yöntemiyle seçilmiş spermlemlerle ICSI işlemi yapılmıştır. Bunlardan 97 adet blastokist gelişmiş ve bunlara trofektoderm biyopsisi yapılmıştır. 235 adet oosit ise PICSI yöntemiyle seçilen spermlemler ile yapılan ICSI işlemi sonrası beşinci gün 129 adet blastokist gelişimi gözlenmiştir. Her iki yöntemle seçilmiş spermlemler ile elde edilen blastokistler trofektoderm biyopsisi yapılmış ve FISH (florasan in situ hibridizasyon) yöntemiyle kromozomların genetik analizi yapılmıştır. İki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p= 0,065).(GRAFİK 1)



Grafik 1: Trofektoderm biyosisi sonrası FISH ile kromozomların genetik analizi yapılan hastaların normal kromozom ve anormal kromozom grafiği

Trofektoderm biyosisi yapılan ve sağlıklı genetik analize sahip olan blastokistler transfer edilmiştir. Hastalara yapılan transfer sonrası gebelik bilgileri toplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda iki yöntem arasında hastaların doğum oranlarında anlamlı bir fark görülmemiştir. (p:0,075)



Grafik 2: FISH sonrası sağlıklı blastokistlerin transfer sonrası gebelik oranları karşılaştırmalı grafiği.

5-TARTIŞMA

Yapmış olduğumuz çalışmada gradyen ve PICSI yöntemiyle seçilmiş spermle yapılan ICSI sonrası elde edilen embriyoların genetik olarak değerlendirmesi yapılmıştır. Bu çalışma toplam 27 hasta üzerinde yapıldı. Bu hastaların yaş ortalaması $29,2\pm 3,1$ (aralık:23-34) dir ve görüldüğü gibi genç hasta grubu ile çalışılmıştır. Bu hastalardan toplam 588 oosit elde edildi. Bunlardan 471 adet oosit m2 (metafaz 2) (%80) matür oositir.Hasta grubunda ovulasyon indüksiyonuna yanıt çok normal görünmektedir. Toplam oositlerin 236 adedi ile gradyen yöntemiyle seçilen spermle ICSI, 235 adedi ile PICSI yöntemiyle seçilmiş spermle ICSI işlemi yapılmıştır (Tablo 2).

İnfertil çiftleri sağlıklı bebek sahibi yapmak ve klinik olarak başarı oranlarını artırmak için birçok çalışma yapılmaktadır. Sperm seçimi bu çalışmaların başında gelmektedir. Sperm seçimi yöntemlerinden en önemlilerinden biride PICSI yöntemi olduğu düşünülmektedir. İnfertilite sorunu olan erkeklerde anöploidi oranının yüksek olduğu bilinmektedir. PICSI yöntemiyle sperm seçimi sonrası elde edilen embriyoların genetik olarak normal olacağı düşünülmektedir. PICSI yöntemiyle seçilmiş spermle yapılan ICSI ile klasik ICSI yöntemi üzerine son yıllarda yapılan bir çalışmada PICSI yöntemiyle seçilen spermle klasik ICSI yöntemine göre anlamlı oranda fertilizasyon sağladığı görülmüştür. Gebelik kayıplarının da PICSI yöntemiyle seçilen spermle elde edilen embriyo transferlerinde anlamlı oranda düştüğü bildirilmiştir⁽⁴⁷⁾.Bu çalışmada gradyen seçimi ile gradyen + PICSI seçimi sonrası uygulanan ICSI yönteminde elde ettiğimiz bulgular, fertilizasyon'un anlamlı bir şekilde PICSI yönteminde arttığını göstermiştir (Tablo 4 , $p=0,003$).

Geniş çaplı yapılan başka bir çalışmada 91 infertilite tedavisi gören çift için uygulanmıştır. Hyaluronan bağlanma testinin oosit

döllenmeside ve biyokimyasal gebelik üzerine önemli düzeyde etkisi olduğu gözlemiştir. ICSI yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada oosit döllenmesi anlamlı düzeyde artarken biyokimyal gebelik oranı azaldığı gözlenmiştir⁽⁴⁸⁾. Bunu yanı sıra diğer bir çalışmada hyalüronan bağlanma testi gebelik potansiyeline daha iyi bir yaklaşım sağlayan objektif, standardize edilebilir bir test olduğu düşünülmektedir⁽⁴⁹⁾. Benzer başka bir çalışmada ICSI yöntemi ile IVF yöntemi hyalüronan bağlanma testi yönünden karşılaştırılmıştır. Temel amaç nedeni bilinmeyen infertil çiftlerde döllenmeye bağlı olup olmadığı ve bunun hyalüronan bağlanma testiyle egale edilebilmesi üzerine yapılmıştır. Ancak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir⁽⁵⁰⁾. Bu çalışma sonuçları da fertilizasyon ile ilgili bizim çalışmamızı doğrulamaktadır.

Başka bir çalışmada ise hiyaluronik asit (HA) içerikli sperm slow medium kullanılarak sperm seçimi ile ICSI yapılırken diğer taraftan PICSI yöntemiyle sperm seçimi yapılarak ICSI yapılmıştır. Bu çalışma sonrasında iyi kalite embriyo elde edilme oranı PICSI yöntemiyle seçilmiş spermle yapılan ICSI anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür⁽⁵¹⁾. Başka bir çalışmada ise hyalüronik asit (HA) bağlama testi uygulanan hastalara yapılan ICSI işlemi sonrası döllenme, embriyo kalitesi ve canlı doğum oranlarına bakılmıştır. Hyalüronan bağlanma testi ile yapılan ICSI işlemi sonrası döllenme, embriyo kalitesi ve canlı doğum oranının arttığı gözlenmiştir⁽⁵¹⁾. Bizim çalışmamız gradient seçimi ile gradient +PICSI uygulamasıyla seçim yöntemleri arasında ;2. Ve 3. Gün blastomer sayısı açısından, nükleasyon açısından, fragmentasyon ve blastomer parlaklığı açısından kısacası embriyo morfolojisi açısından istatistiki bir farklılık olmadığını gösterdi (Tablo 4).5. gün yapılan trofoektoderm biyopsisi sonuçları da PICSI yönteminin kromozomal aneuploidi'leri azaltmadığını gösterdi (grafik 1,p=0,065).

Sperm hazırlanmasında uygulanan yöntemlerin swim-up (sperm yüzdürme) ve gradyen (sperm yoğunluk sıralayıcı yöntem) ile elde edilen spermelerin matürasyonu yönünden hyalüronan bağlanma testi ile karşılaştırmasında hiçbir fark gözlenmemiştir⁽⁵³⁾. Bu nedenle çalışmamızda gradyen yöntemiyle seçilmiş spermiler ile ICSI yöntemi uygulanmıştır.

Sperm seçim yöntemlerinin geleneksel ICSI yöntemiyle seçimi ile hyalüronan bağlayıcı yöntemle seçimi üzerine yapılan çalışmada spermilerin sperm akrinin turuncu florasanla boyanmasıyla DNA bütünlükleri karşılaştırılmıştır. Geleneksel ICSI seçilen spermiler ile PCSI yöntemiyle seçilen spermilerin DNA bütünlüğü bağlamında hiçbir fark gözlenmemiştir⁽⁵⁴⁾.

Yapılan bir başka çalışmada akrozomal enzim kusuru olduğu bilinen çiftlere IVF yöntemiyle döllenme gerçekleşmezken ICSI yöntemi uygulandığında döllenme gerçekleşmiştir. Düşük hyalürinidaz enzim aktivitesi olan çiftlerde başarı oranı ICSI yöntemiyle arttığı gözlenmiştir⁽⁵⁵⁾.

Sperm hyalüronan bağlanmasının döllenmeyi olumlu yönde etkilediği ve başarıyı arttırdığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada hyalüronan bağlanmasının önemli bir faktör olduğu döllenme ve embriyo gelişimini olumlu etkilediği düşünülmektedir⁽⁵⁶⁾.

Embriyolojik dönemde embriyoların genetik incelenmesi için bilinen ve en yaygın uygulanan yöntemlerden biride FISH (florasan in situ hibritasyon) yöntemidir. Preimplantasyon genetik tanı yöntemlerinden biridir ve belirli sayıda kromozom incelemesinde önemli bir başarıya sahiptir. Yapılan bir çalışmada embriyolara anöploidi oranları üzerine FISH yöntemiyle aynı embriyolara birden fazla blastomer biyopsisi yapıldı ve anlamlı olarak sapma gözlenmedi. Embriyolardan 13, 16, 19, 21, 22, X ve Y kromozomları üzerine yapılmıştır ve FISH yönteminin başarılı olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁷⁾.

Kromozomal anöploidiler üzerine yapılan çalışmalardan bir başkasından oligoastenozoospermatozoa (OAT) hastası erkeklerin perifer kanda karyotip analizi yapılmış ve normal olduğu gözlenmiştir. Aynı hastaların spermleri FISH yöntemiyle 13, 18, 21, X ve Y kromozomları incelenmiştir. Kontrol grubu normal sperme sahip ve periferik kanda karyotip analizi normal olan erkeklerle karşılaştırılmış ve OAT hastalarının spermlerinin kromozomal olarak kontrol grubundan anöploidi oranı daha yüksek olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁸⁾. Yapılan başka bir çalışmada tekrarlayan gebelik kayıpları veya tekrarlayan implantasyon yetersizliklerinde anormal spermlerin kromozomal anöploidi olgularının genetik yönden incelemelerinde FISH yöntemi önemli ölçüde destek vermektedir⁽⁵⁹⁾.

Çalışma grubundaki 27 hastanın eşlerinden 3 gün cinsel pehriz sonrası sperm örneği alınmış alınan spermlerin bazal değerleri sperm volumü $2,2 \pm 0,8$ ($\mu \pm \sigma$), sperm sayısı $54,1 \pm 32,4$ ($\mu \pm \sigma$) ml/sayı (milyon), sperm motilitesi $50,4 \pm 12,4$ ($\mu \pm \sigma$) (%), sperm morfolojisi $7,1 \pm 1,1$ ($\mu \pm \sigma$) (%) ortalama değerler gözlenmiştir. Bu değerler WHO (dünya sağlık örgütü) 2010 yılı semen analizi değerleri için normal olarak değerlendirilmektedir⁽²⁰⁾. (Tablo 3) İkinci gün embriyo değerlendirmesinde embriyoların hücre bölünmesi, blastomerlerde nükleasyon, fragmentasyon oranı ve blastomerlerin renk görünümü dikkate alınmıştır. Buna göre ikinci gün için gradyen yöntemiyle sperm seçimi ile ICSI ve PICSI yöntemiyle sperm seçimi ile ICSI yapılan oositlerden edilen embriyolarda hücre sayısı 4 hücre ve üstü olarak $p=0,346$, blastomerlerde çekirdek gözlenme $p=0,100$, embriyo içinde fragmentasyon $p=0,717$ ve blastomerlerin parlaklık görünümü $p=0,297$ olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda ikinci günde embriyo değerlendirmesi gelişimi arasında anlamlı bir fark olduğu görülmemiştir. (TABLO 4)

Üçüncü gün embriyo değerlendirmesinde de ikinci günde embriyo değerlendirmesinde aynı parametreler dikkate alınmıştır. Buna göre

üçüncü gün embriyo gelişimi için gradyen yöntemiyle sperm seçimi ile ICSI ve PICSI yöntemiyle sperm seçimi ile ICSI yapılan oositlerden edilen embriyolarda hücre sayısı 8 hücre ve üstü olarak $p=0,383$, blastomerlerde çekirdek gözlenme $p= 0,341$, embriyo içinde fragmantasyon $p=0,487$ ve blastomerlerin parlaklık görünümü $p=0,932$ olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda üçüncü gün embriyo gelişimi değerlendirmesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark olduğu görülmemiştir.(Tablo 4)

Hastaların embriyo gelişimleri beşinci gününde blastokist değerlendirmesi yapıldı. Toplam 471 matür oosite yapılan işlem sonrasında bunlardan 226 tanesi beşinci gün trofektoderm biyopsisi için uygun blastokisti. 236 adet oosit gradyen yöntemiyle seçilmiş spermlerin ICSI işlemi yapılmıştır. Bunlardan 97 adet blastokist gelişmiş ve bunlara trofektoderm biyopsisi yapılmıştır. 235 adet oosit ise PICSI yöntemiyle seçilen spermler ile yapılan ICSI işlemi sonrası beşinci gün 129 adet blastokist gelişimi gözlenmiştir. Her iki yöntemle seçilmiş spermler ile elde edilen blastokistler trofektoderm biyopsisi yapılmış ve FISH (florasan in situ hibridizasyon) yöntemiyle kromozomal genetik analiz yapılmıştır. Ve gradyen yöntemiyle seçilen spermler ile PICSI yöntemiyle seçilen spermler arasında $p= 0,065$ sonucu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç doğrultusunda iki yöntem arasında FISH yöntemiyle genetik analizinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir .

27 hastaya yapılan sağlıklı embriyo transferinde gebelik oranları gradyen yöntemiyle seçilen spermlerle yapılan ICSI işleminin PICSI işlemiyle seçilen spermlerle yapılan ICSI işlemine oranla istatistiki olarak fark görülmemiştir ($p=0,075$).

Ludvico Parmegiani ve arkadaşlarının 2010 da yaptıkları retrospektif bir çalışmada geleneksel teknik ile PICSI yöntemi kıyaslanmış ve HA bağlanma yöntemi ile daha fazla iyi kaliteli embriyo geliştiğini ve gebeliklerin istatistiki olarak anlamlı bir yükselme gösterdiğini açıkladılar (60).

Yine Renata F.Erberelli ve arkadaşları (2017) erkek faktörlü infertilitede HA bağlanması gösteren spermilerin seçiminin klinik gebelik oranlarını artırdığını gösterdiler (61) . Literatür bulgularında HA seçimi ile yapılan ICSI işlemi sonuçlarının yararları veya hiçbir etkisinin bulunmadığı konusu tartışmalıdır.Hyaluronik asit spermier için doğal fertilizasyon ortamında bulunması gereken bir ajan olması açısından embriyo gelişiminde zararlı bir etkisi de ortaya konmamıştır (62). Bizim bulgularımız sperm parametrelerinin normal olduğu koşullar ile sınırlandırılabilir. Gerçekten de bu tür sperm seçiminin erkek faktörlü olgulardaki başarısından söz edilmektedir. Araştırmacılar ortaya çıkması olası görülen genetik anomalileri elimine edeceği konusunda pozitif düşüncelerine karşın, bizim çalışmamız hyaluronik asit bağlanmış spermilerin seçiminin genetik anomali oranını değiştirmediğini göstermiştir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgulara göre Hyaluronik asit bağlanma yönteminin açıklanamayan infertil olgulardaki başarısının tartışmalı olduğunu ileri sürebiliriz.

KAYNAKLAR

- 1- Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet* 1992; 340(8810): 17-18
- 2- Kane SC, Willats E, Bezerra Maia E, Holanda Moura S, Hyett J, da Silva Costa F. Et al. Pre-Implantation Genetic Screening Techniques: Implications for Clinical Prenatal Diagnosis. *Fetal Diagn Ther*. 2016; 40(4): 241-254
- 3- Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Hotaling J, Carrell DT. Et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014; 29(11): 2402-2412.
- 4- Jiang WJ, Jin F, Zhou LM. Et al. Influence of the DNA integrity of optimized sperm on the embryonic development and clinical outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2016; 22(5): 425-31.
- 5- Rashki Ghaleno L, Rezazadeh Valojerdi M, Chehrazi M, Sahraneshin Samani F, Salman Yazdi R, Et al. Hyaluronic Acid Binding Assay Is Highly Sensitive to Select Human Spermatozoa with Good Progressive Motility, Morphology, and Nuclear Maturity *Gynecol Obstet Invest* 2016; 81(3): 244-250
- 6- Piprek RP, Kloc M, Kubiak JZ, et al. Early Development of the Gonads: Origin and Differentiation of the Somatic Cells of the Genital Ridges. *Results Probl Cell Differ*. 2016; 58: 1-22.
- 7- Puerta-Fonollá AJ. Morphogenesis of the human genital tract. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* 1998; 103(4):3-15
- 8- Gilchrist RB. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2011; 23(1): 23-31.

- 9- Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N, et al. Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2016; 58: 167-190.
- 10- Richards J.S., Stephanie A.P, et al. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 2010;120(4): 963-972.
- 11- Koopman P. The Curious World of Gonadal Development in Mammals. *Curr Top Dev Biol.* 2016; 116: 537-545.
- 12- Mecklenburg JM, Hermann BP, et al. Mechanisms Regulating Spermatogonial Differentiation. *Results Probl Cell Differ.* 2016; 58: 253-287.
- 13- Chojnacka K, Zarzycka M, Mruk DD, et al. Biology of the Sertoli Cell in the Fetal, Pubertal, and Adult Mammalian Testis. *Results Probl Cell Differ.* 2016; 58: 225-251.
- 14- Mawhinney M, Mariotti A, et al. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol 2000.* 2013; 61(1): 232-251
- 15- Cooper TG. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl.* 2011; 13(1): 130-8.
- 16- Delbaere A, Devreker F, Hannes M, Koenig I, Holoye A, Englert Y, et al. Evolution of ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Rev Med Brux.* 1999; 20(5): 446-452
- 17- Brinsmead M, Stanger J, Oliver M, Shumack J, Raymond S, Clark L, et al. A randomized trial of laparoscopy and transvaginal ultrasound-directed oocyte pickup for in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1989; 6(3): 149-154.
- 18- De Vos A, Van Landuyt L, Van Ranst H, Vandermonde A, D'Haese V, Sterckx J, Haentjens P, Devroey P, Van der Elst J, et al. Randomized sibling-oocyte study using recombinant human hyaluronidase versus bovine-derived Sigma hyaluronidase in ICSI patients. *Hum Reprod.* 2008; 23(8): 1815-1819.

- 19- Zacharias S. Morphological classification of the stage of maturation of oocytes recovered in an in vitro fertilization program. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 1985; 50(4): 299-304.
- 20- World Health Organization, WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen- 5 th ed. Switzerland, 2010.
- 21- Menkveld R., Holleboom C.A.G, Rhemrev J.P.T., et al. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl.* 2011; 13(1): 59–68.
- 22- Makler A. A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil Steril.* 1978 S; 30(3): 313-318.
- 23- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, Morshedi M, Brugo S. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology.* 1987; 30(3): 248-251.
- 24- Kieffer GH. IVF (in vitro fertilization) *The American Biology Teacher.* 1980; 42(4): 211-231.
- 25- Mantikou E, Youssef MA, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, et al. Mastenbroek S. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2013; 19(3): 210-220.
- 26- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992; 340(8810): 17-18.
- 27- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Taraborrelli S, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M, et al. Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSi vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril.* 2012; 98(3): 632-637.

- 28- Tesarik J, Greco E, et al. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999;14(5):1318-1323.
- 29- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011; 26(6): 1270-83.
- 30- Montag M, Liebenthron J, Köster M, et al. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta.* 2011; 32(3): 252-256.
- 31- Racowsky C, Author C, Vernon M, Mayer J, Ball GD, Behr B, Pomeroy KO, Winingar D, Gibbons W, Conaghan J, Stern JE, et al. Standardization of grading embryo morphology. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27(8): 437–439.
- 32- Gardner DK, Schoolcraft WB, et al. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999; 11(3): 307-11.
- 33- Bos-Mikich A, Michels MS, Dutra CG, Oliveira NP, Ferreira MO, Aquino DC, Frantz N, et al. The impact of age on blastocyst scoring after single and double embryo transfers. *JBRA Assist Reprod.* 2016; 20(1): 27-32.
- 34- Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19(4): 4328.
- 35- Longo LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. The chromosome number in man. *Am J Obstet Gynecol.* 1978; 130(6): 722.
- 36- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes *Science.* 1996; 273(5274): 494-7.

- 37- Matti S. Al-Aish. Human chromosome morphology. I. Studies on normal chromosome characterization, classification and karyotyping. Canadian Journal of Genetics and Cytology 1969; 11(2): 370-381 (1969)
- 38- Therman E, Millard S, et al. Human Chromosomes Structure, Behavior 3 th. Ed. Effects, 1993, New York, Springer-Verlag.
- 39- Elder K, Dale B. "İn Vitro Fertilizasyon". İrez T. (Çev) 3. Baskı. İstanbul. Nobel yayınevi. 2013
- 40- Nussbaum, Robert L, McInnes, Roderick R, Willard, Huntington F, "Genetics in Medicine" 1st ed. ABD. Philadelphia, PA: Elsevier / Saunders, 2016
- 41- Ian D Young. Medical Genetics 1st Ed. Oxford University Press. England, Oxford University Press, 2005.
- 42- Chappelle A, Terry FS, Burke CB, Christensen K, et al. Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals 1 st ed. Washington (DC): Genetic Alliance; 2009
- 43-Andrew P. "Chromosome abnormalities". Human Molecular Genetics 2nd ed.. New York, Wiley–Liss 1999.
- 44-De Marchi M, Carbonara AO, Carozzi F, Massara F, Belforte L, Molinatti GM, Bisbocci D, Passarino MP, Palestro G, et al. "True hermaphroditism with XX/XY sex chromosome mosaicism: Report of a case". Clinical Genetics. Clin Genet. 1976; 10(5): 265-272.
- 45- Zamani G. A. "Genetik Tanı Yöntemleri" Türk toraks derneği. 2015; 2(1): 143-161.
- 46- Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Pehlivan Budak T, Renwick P, De Rycke M, Geraedts JP, Harton G, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection Hum Reprod Update. 2012; 18(3): 234-247.

- 47- Mokánszki A, Tóthné EV, Bodnár B, Tándor Z, Molnár Z, Jakab A, Ujfalusi A, Oláh É, et al. Is sperm hyaluronic acid binding ability predictive for clinical success of intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. ICSI? *Syst Biol Reprod Med*. 2014; 60(6): 348-354.
- 48- Esterhuizen AD, Franken DR, Bosman E, Rodrigues FA, Van Rensburg JH, Van Schouwenburg JA, Lombaard C, et al. Relationship between human spermatozoa-hyaluronan-binding assay, conventional semen parameters and fertilisation rates in intracytoplasmic spermatozoa injection. *Andrologia*. 2015; 47(7): 759-764.
- 49- Szucs M, Osvath P, Laczko I, Jakab A, et al. Adequacy of hyaluronan binding assay and a new fertility index derived from it for measuring of male fertility potential and the efficacy of supplement therapy. *Andrologia*. 2015 ; 47(5): 519-524
- 50- Kovacs P, Kovats T, Sajgo A, Szollosi J, Matyas S, Kaali SG, et al. The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28(1): 49-54.
- 51- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Taraborrelli S, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M, et al. Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril*. 2012; 98(3): 632-637.
- 52- Beck-Fruchter R, Shalev E, Weiss A, et al. Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2016; 32(3): 286-298.

- 53- Tachawiwat K, Getpook C, Geater A, et al. Comparison of hyaluronan binding assay scores of spermatozoa using swim-up techniques and density gradient centrifugation. *J Med Assoc Thai.* 2015; 1(2): 84-91
- 54- Huang MT, Kuo-Kuang Lee R, Lu CH, Chen YJ, Li SH, Hwu YM, et al. The efficiency of conventional microscopic selection is comparable to the hyaluronic acid binding method in selecting spermatozoa for male infertility patients. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2015; 54(1): 48-53.
- 55- Abdul-Aziz M, MacLusky NJ, Bhavnani BR, Casper RF, et al. Hyaluronidase activity in human semen: correlation with fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1995; 64(6): 1147-1153.
- 56- Yalçinoğlu ES. PICSİ dishi ile seçilen sperm ile elde edilen embriyoların kalitesi ve bunun gebelik oranı üzerine etkisi. Tez yayını. 2012 istanbul
- 57- Sasabe Y, Katayama KP, Nishimura T, Takahashi A, Asakura H, Winchester-Peden K, Wise L, Abe Y, Kubo H, Hirakawa S, et al. Preimplantation diagnosis by fluorescence in situ hybridization using 13-, 16-, 18-, 21-, 22-, X-, and Y-chromosome probes. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16(2): 92-96.
- 58- Andreescu NI, Cosma M, Farcaş SS, Stoian M, Amzăr DG, Puiu M. Assessment of chromosomal aneuploidies in sperm of infertile males by using FISH technique. *Rom J Morphol Embryol.* 2016; 57(1): 173-178.
- 59- Kohn TP, Kohn JR, Darilek S, Ramasamy R, Lipshultz L, et al. Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33(5): 571-576.
60. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection.

J Assist Reprod Genet. 2010 Jan;27(1):13-6. doi: 10.1007/s10815-009-9380-0. Epub 2009

61. Renata F Erberelli, Renato M Salgado, Dirceu H Mendes Pereira, and Philip Wolff ; Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility JBRA Assist Reprod. 2017 Jan-Mar; 21(1): 2–6. doi: 10.5935/1518-0557.20170002
PMCID: PMC5365191

62. Van Den Bergh M, Fahy-Deshe M, Hohl MK. Pronuclear zygote score following intracytoplasmic injection of hyaluronan-bound spermatozoa: a prospective randomized study. Reprod Biomed Online. 2009;19:796–801. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.09.022> [PubMed]

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

ADI	Nazmi Selman	SOYADI	KAL
DOĞUM YERİ	Konya-Ereğli	DOĞUM TARİHİ	01.01.1988
UYLUĞU	TC	TC NO	45694548308
E_MAIL	nazmiselman@gmail.com	TEL	+90 548 858 4888

Eğitim Düzeyi

	MEZUN OLDUĞU KURUMUN ADI	MEZUNİYET YILI
LİSANS	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi	2013
LİSE	Konya-Ereğli Anadolu lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sırala)

GÖREVİ	KURUM	YILI
EMBRİYOLOG	U.K.F.C.A. Tüp Bebek Merkezi (KKTC - gazimagusa)	2015-Halen Çalışmakta
EMBRİYOLOG	Medical center lancet (Gürcistan- tiflis)	2014-2015
EMBRİYOLOJİ LAB. ASİSTANI	Taksim alman hastanesi	2014 (ilk 6 ay)

YABANCI DİLLER	ANLAMA	KONUŞMA	YAZMA
İngilizce	İyi	Orta	Orta
Gürcüce	Orta	Kötü	Yok

	SAYISAL	EŞİT AĞIRLIK	SÖZEL
Ales Puanı(2012)	67,94	65,77	58,94

EKLER

14.07.2017

İLGİLİ MAKAMA;

Yeni Yüzyıl Üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü klinik embriyoloji yüksek lisans öğrencilerinden Nazmi Selman KAL'ın tez çalışması için U.K.F.C.A. TÜP BEBEK LTD. yapılan işlemlerin datalarını hasta ismi saklı kalacak şekilde kullanmasına izin verilmiştir.

U.K.F.C.A. TÜP BEBEK LTD. KKTC

YÖNETİM KURULU BAŞKANI

DR. HALİL İBRAHİM TEKİN

