

T.C.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE, SPERM KAYNAĞINA GÖRE
ICSI İŞLEMİ İLE ELDE EDİLEN EMBRİYOLARIN
EMBRİYO İZLEMİYÖNTEMİ İLE RETROSPEKTİF OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ.

ALİ BURAN

DANIŞMAN

PROF. DR. TÜLAY İREZ

İSTANBUL-2015

T.C.
YENİ YÜZYIL üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

Savunma Tarihi: .../.../2015

Prof. Dr. Tülay İrez
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Danışman
Jüri Başkanı

Prof. Dr. İbrahim Halil Çevik
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Nurten Dayıoğlu
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ALİ BURAN

imza

İTHAF

Sevgili Ođlum EYMEN BURAN'a ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini paylaşan, değerli danışmanım sayın **Prof. Dr.TÜLAY İREZ'e**, Yüksek lisans eğitimimde, işe başladığım günden beri bana yardımcı olan, derin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli klinik başkanımız**Prof. Dr. MUSTAFA BAHÇECİ 'ye**,Tezimin yazımı için desteklerini esirgemeyen sayın **Doç.Dr.EMRE BAKIRCIOĞLU'na**, Yüksek lisans eğitimimde beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşım **Emb. TURAN AKSOY'a**, yüksek lisans tezimi yazarken bana destek olan değerli koordinatörümüz **Dr. NECATİ FINDIKLI'ya** teşekkürlerimi borç bilirim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca benimle ilgilenen, destekleriyle yol gösteren, değerli bilgilerini benimle paylaşmasıyla birlikte, desteğini her zaman hissettiren ve iyi ki var dediğim çok değerli hocam **Dr.ERCÜMENT YÜNCÜLER'e**, tez yazımdaki istatistik değerlendirmelerinde bana yardımcı olan sayın**Yrd.Doç.NURTEN DAYIOĞLU'na** ve **HAKAN YÜCETAŞ'a**, yüksek lisans eğitimimde tanıştığım ve desteğini hep üzerimde hissettiğim **Emb.ÖZCAN DÜZCÜ'ye**, Eğitimime başladığım ilk günden beri bana her konuda yardımcı olan ve manevi gücü bana hissettiren çok kıymetli Babam **MUHARREM KARAAĞAÇ'a**, çok teşekkür ederim.

Tez yazım aşamamda yardımlarını esirgemeyen arkadaşım **Emb.CİHAN GÖKTAŞ'a** ve manevi desteklerini hissettiren arkadaşlarım **Emb.AHMET ZORLU,Emb.ORÇUN OLCAY'a,Emb.BİLGEN ÖZTÜRK'e,Emb.ASUMAN İŞLER'e** ve **ASUMAN ARSLAN'a** çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana maddi-manevi destek olan annem **AYŞE BURAN'a** ve **KEZBAN KARAAĞAÇ'a**,sabrı ve bana olan güveni için sevgili eşim **MERYEM BURAN'a**sonsuz kez teşekkür ederim.

Bu alışma, **BAHÇECİ SAĞLIK GRUBU** tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN	İİ
İTHAF	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
BİLGİ.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
GRAFİKLER LİSTESİ.....	Xİİİ
SEMBOLLER/KISALTMALAR.....	XIV
ÖZET	XVI
ABSTRACT	XVİİİ
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Oosit (Yumurta)gelişimi ve laboratuvarında değerlendirilmesi.....	4
2.2. Spermatozoa.....	6
2.3 Semen analizi	9
2.3.1 Yıkama ve doğrudan yüzdürme metodu.....	9
2.3.2 Yoğunluk sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi.....	9
2.3.3 Sperm Dansitesi/konsantrasyonu ölçümü; Hemositometrik yöntem.....	10
2.3.4 Sperm konsantrasyonunun Makler sayma kamarası ile ölçümü.....	11

2.3.5 Kruger kriterlerine dayalı morfolojik (şekilsel) değerlendirme (WHO,2010)...	12
2.4 Azoospermi.....	13
2.4.1 Tıkanıklığa Bağlı Azospermi:.....	14
2.4.1.1 MESA yöntemi.....	14
2.4.2 Tıkanıklığa Bağlı Olmayan Azospermi:.....	14
2.5 Testisten elde edilen dokularda sperm araştırılması.....	17
2.6 IMSI yöntemi:	18
2.7 İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI):.....	19
2.8 Kültür ortamında Embriyo gelişimi.....	21
2.8.1 Bölünme Evresi Sınıflaması.....	20
2.8.2 Erken embriyogenezde ileri dönem (4-6. Günler).....	21
2.8.3 Blastokist skorlaması (2010).....	22
2.9 EMBRİYOSKOP (Embryoscope).....	22
2.9.1 Embriyo gelişiminin canlı olarak izlenmesi ve inkübasyonu.....	22
2.9.2 Embriyoskop cihazının özellikleri.....	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1 Çalışmaya alınan gruplar ve özellikleri	27
3.2 Semen analizi Uygulaması.....	28
3.2.1 Yoğunluk sıralayıcısı ,Gradient, hazırlama işlemi.....	29
3.2.2 TESE Metaryelinden İCSİ işlemi için sperm hazırlanması	30
3.2.3 MESA Metaryelinden İCSİ işlemi için sperm hazırlanması.....	31
3.3 İMSİ İŞLEMİ	32
3.4 Folikül aspirasyonu, denudasyon ve İCSİ işlemi.....	33
3.5 Embriyo Kültürü ve İnkübasyonu.....	35

3.6 Kullanılan malzemeler:.....	36
4.BULGULAR.....	37
5.TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR	53
ETİK KURUL KARARI	60
ÖZGEÇMİŞ	61

TABLULAR LISTESİ

Tablo 1. Semen Analizi Kruger Kesin Kriterleri Dünya sağlık örgütü (WHO)	12
Tablo 2: Bölünme evresinde embriyo sınıflaması (Eshre ,ASRM,2010).....	20
Tablo 3: Embriyo gelişiminin 4. gününde sınıflama (ESHRE,Alpha,ASRM)(50).....	22
Tablo 4: İç hücre kitlesi skorlaması.....	22
Tablo 5: Trofoektoderm skorlaması.....	22
Tablo 6: Sperm kaynağı gruplarında yaş ve oosit bilgileri	37
Tablo 7: 1 ve 2 embriyo transferinin gruplar arasında dağılımı.....	38
Tablo 8:Embriyo transfer gününün farklı sperm kaynağı gruplarında dağılımı.....	38
Tablo 9: Ejekülat spermi, tese ve mesa gruplarında transfer edilen 1. embriyonun durumu.....	38
Tablo 10 : Ejekülat spermi, tese ve mesa gruplarında transfer edilen 2. embriyonun durumu.....	38
Tablo 11: Gruplarda pozitif ve negatif gebelik oranları	39
Tablo 12 : tese ,mesa ve normospermi gruplarında embriyo gelişim zamanları.....	40
Tablo 13 : TESE ,MESA ve Kontrol gruplarında embriyo gelişim ara fazları zamanlaması.....	43
Tablo 14.Gruplarda t8, morula ve blastokiste ulaşma oranları.....	43
Tablo 15: pozitif ve negatif gebelik gruplarında yaş ve oosit bilgileri.....	44
Tablo 16: Gruplarda gebelik pozitif ve negatif olguların transfer edilen embriyo sayısının yüzde dağılımı.....	45
Tablo 17: Gebelik negatif veya pozitif olgularda transfer gününün yüzde dağılımı.....	45

Tablo18: Gebelik pozitif ve negatif olgularda transfer edilen 1. Embriyonun gelişim basamağı	45
Tablo 19: Gebelik pozitif ve negatif olgularda transfer edilen embriyonun gelişim aşamasının yüzdesi	45
Tablo 20:Pozitif veya negatif gebelik gruplarında embriyo gelişim zamanları.....	46
Tablo 21: Tüm gruplarda Gebe olan ve olmayan hastalarda embriyo gelişim zamanları.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 : Spermatozoa çizimi.....	6
Şekil 2 : Spermatozoa ultrastrüktürel yapısı.....	7
Şekil 3 Sperm membran maturasyonunun testis ve epididimiste çizim.....	8
Şekil 4 Neubauer kamerasında sayma alanları	10
Şekil 5 : Kruger morfolojik kriterlerine göre sperm morfolojisi değerlendirilmesi.....	13
Resim 1. Memeli Oosit.....	4
Resim 2. Makler kamerası.....	11
Resim 3 : Mikro tесе ile testisten genişlemiş seminifer tubullerinin çıkarılması.....	16
Resim 4: Perkütan sperm aspirasyonu ile elde edilen spermlerin Eosin-Y ile boyanarak vitalitesinin incelenmesi.....	16
Resim 5. Tese örneğinin disekte edildikten sonraki durumu ;tübüller parçalanmış.....	17
Resim 6: IMSI işlemi ile normal sperm seçimi	18
Resim 7 : İki pronukleus gözlenen normal döllenmiş zigot	19
Resim 8: Bölünme evresinde embriyolar	20
Resim 9: 4. - 6. günlerde embriyolar	21
Resim 10 : EmbryoScope embriyo izleme sistemi	23
Resim 11 :Embryoskopta bir hastaya ait toplu görüntüleme ekranı	25
Şekil 6:EmbryoScope cihazı bölmeleri.....	25
Resim 12: <i>Kruger strict</i> boyama ile elde edilmiş normal morfolojik yapıya sahip spermatozoolar 40X).....	28

Resim 13: Akrozomal Şekil Bozukluğu	28
Resim 14: Boyun dropletleri (siyah oklar).....	29
Resim 15: Yoğunluk sıralayıcı katmanları	30
Resim 16 : Tese örneklerinin parçalanması (diseksiyonu	31
Resim 17: İMSİ işlemi ile seçilmiş normal morfolojiye sahip spermatozoonlar.....	32
Resim 18: İMSİ işlemi ile seçilmiş anormal başlı spermler	32
Resim 19: İMSİ işlemi ile seçilmiş spermde boyun dropleti	32
Resim 20: Oosit inkübasyon kültür kabı	33
Resim 21: İCSİ petrisi	33
Resim 22: İCSİ İşlemi	34
Resim 23; embriyoya kadar takip edilebilen <i>embryoskop</i> cihazı ve <i>embryoslide</i> kabının görünüşü.....	34

GRAFİKLER

Grafik 1 : Tese, mesa ve ejakülat spermi gruplarında pozitif gebelik oranları.....39

Grafik 2--: Tese, mesa ve ejakülat spermi gruplarında embriyo gelişim zamanları.....41

Grafik -3-: gebelik pozitif ve negatif olgularda embriyo gelişim zamanları.....47

SEMBOLLER /KISALTMALAR LİSTESİ

CCD: Charge Coupled Device ,Işığa duyarlı yüzey

EBSS:Earl's Balanced Salt solution

FDA : Food and Drug Administration,Amerika gıda ve ilaç dairesi.

FSH : Follicle stimulating hormone,Foliküler stimülant hormon

GV:Germinal vesikül

ICSI : Intracytoplasmic Sperm Injection,İntra stoplazmik sperm enjeksiyonu

IUI : Intra uterin insemination , Aşılama

IVF : İn-vitro fertilizasyon

İMSİ : İntrastoplazmik morfolojik olarak secilmiş sperm enjeksiyonu

LH:Luteinizing hormone , lüteinleştirici hormon

MESA:Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu

MHTF: Modified Human Tubal Fluid,Değiştirilmiş insan tubal sıvısı

M1: Metafaz 1

M2 : Metafaz 2

OPU:Oocyte Pick-Up,Yumurta toplama

PB2:ikinci Polar Cisimcik

PCO : Polycystic ovary syndrome,Polikistik over sendromu

PESA : Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration-Perkutan epididimal sperm aspirasyonu

PGT:Preimplantasyon Genetik Tanı

PM:Plasma membrane ,plazma zarı

PN:Pronukleus

PVP : Polyvinylpyrolidone

RBC : Red Blood Cell,Kırmızı kan hücresi

TESE: Testicular Sperm Extraction-Testisten sperm ekstraksiyonu

t2: İki hücreye bölünme zamanı

t2: İki hücreye bölünme zamanı

t3: Üç hücreye bölünme zamanı

t4: Dört hücreye bölünme zamanı

t5: Beş hücreye bölünme zamanı

t6: Altı hücreye bölünme zamanı

t7: Yedi hücreye bölünme zamanı

t8: Sekiz hücreye bölünme zamanı

t9+: Dokuz hücreye ulaşma zamanı

tM: Morula evresine ulaşma zamanı

tSB: Blastülasyonun başlangıcı

tB: Blastosist evresine ulaşma zamanı

WHO:World Health Organization ,Dünya sağlık örgütü

ÖZET

Buran A. infertilitede,sperm kaynağına göre , İCSI işlemi ile elde edilen embriyoların embriyo izleme yöntemi ile retrospektif olarak değerlendirilmesi. . Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2015

Amaç: Sürekli embriyo izleme sistemi embryo seçiminde embriyo morfolojisi ve bölünme kinetiği parametreleri dikkate alınarak embriyo seçiminde yeni bir çalışma alanı oluşturmuştur.Sperm kalitesinin embriyo gelişimi üzerine negatif etkileri bilinmektedir.İleri derecede erkek faktörlü olgularda fertilizasyon ve embriyo gelişiminde sorunlar görülmektedir.Azoospermik olgularda sperm bulmada kullanılan TESE ve MESA uygulamaları sonucu elde edilen embriyoların gelişim süreçleri ile ilgili ayrıntılı bir bilgi görülmemiştir.Bu nedenle bu çalışmada azoospermik olgularda ICSI sonrası gelişen embriyoların sürekli embriyo izleme sisteminde retrospektif olarak değerlendirilmesi, TESE ve MESA işlemi sonrası gelişen embriyoların morfokinetik parametrelerinin normal spermler ile gelişen embriyolar ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyalve metod: Bahçeci IVF merkezinde uygulaması yapılan 58 hasta (20 normal sperimli,20 TESE ve 18 MESA uygulaması) bu çalışmada yer almıştır. Bu çalışmaya genetik kaynaklı erkek faktörlü olgular (vas agenezi, klinefelter, Y kromozomu mikrodelesyonu) ile PCO,endometriosis ve ileri kadın yaşı faktörlü hastalar dahil edilmemişlerdir.Çalışmada 758 embriyonun fertilizasyon ve klivaj aşamaları 5. Güne kadar retrospektif olarak izlenmiş, sonuçların değerlendirilmesi için student's t-testi, Chi-Square, Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular: Tese ve Mesa grubunda PB2 atılımından PN oluşumuna kadar geçen sürenin normal kontrollere göre daha kısa olduğu ($p=0.0005$), PN silinmesinin ise uzun olduğu gözlenmiştir ($p=0.0001$).PN oluşumundan t2'ye geçişin tesa ve mesa gruplarında normospermiye göre daha uzun olduğu görülmüştür ($p=0.0001$). 5,7,8,9 blastomerli embriyo'ya geçiş sürelerinin tese grubunda daha kısa olduğu görülmüştür ($p=0.0005$,

p=0.0005,p=0.0012). Blastokist oluşum zamanının ise mesa grubunda normospermik ve tese grubuna kıyasla 12 saat daha uzun olduğu görülmüştür (p=0.0009). Blastokiste gidiş normospermide %70 iken, tese'de %35, mesa'da % 27.8 bulunmuştur (p= 0.018). Pozitif gebelik oranları tesa ve normospermik grupta benzer (% 55,% 55) mesa grubunda ise düşük olduğu gözlenmiştir (%39).

Tartışma:Çalışmada sperm kaynağına bağlı olarak embriyo gelişim süreçlerinde istatistiki anlamlı farklılıklar görülmüştür. Mesa grubunda blastokiste gidiş oranının düşük olması ve süresinin uzun olması, ve pozitif gebelik oranının düşük bulunması ,obstrüktif azospermide mesa işleminin yararını tartışmalı hale getirmektedir.

Anahtar kelimeler: tese, mesa, azospermi, ICSI, sürekli embriyo izleme sistemi

ABSTRACT

Buran A. Retrospective comparison of embryos according to sperm origin by time-lapse imaging after ICSI procedure. Yeni Yuzyil University Medical Sciences Institute, Clinical Embryology Program. Master's Thesis. Istanbul. 2015

Purpose: Time-lapse imaging system which takes embryo morphology and cleavage kinetics into consideration opened a new field of study in choosing the best embryos. It is well known that low sperm quality has negative effects on embryo development. Problems in the fertilization and embryo development are observed in cases with severe male factor. However, there isn't enough information about the embryo development in cases which sperm is obtained by TESE and MESA procedures from azoospermic male patients. Thus, this study aims to compare the embryo developments in which ejaculate sperms and TESE/MESA sperms are used by time-lapse imaging and morphokinetic parameters.

Material and Methods: This study was conducted in Bahceci IVF Centre and it includes total of 60 patients (20 ejaculate sperm, 20 TESE sperm, 18 MESA sperm). In this study, patients with male factor because of genetic problems (Vasogenic, Klinefelter syndrome, Y chromosome microdeletion) and PCO, endometriosis and advanced maternal age were excluded. In this study, fertilization and cleavage stages until 5th day of 425 embryos were observed and recorded retrospectively. For the statistical analysis, student's t-test, Chi-Square, Kruskal Wallis test and Mann Whitney U test were used.

Results: In TESE and MESA groups, it is observed that the time between removal of second polar body and appearance of PN is shorter ($p=0.0005$) and disappearance of PN is longer ($p=0.0001$). The time between appearance of PN and t2 was longer in TESE and MESA groups than normospermia ($p=0.0001$). The time needed for embryos to reach the stage with 5, 7, 8, 9 blastomeres was shorter in TESE group ($p=0.0005$, $p=0.0005$, $p=0.0012$). For

embryos in which MESA sperms were used needed 12 more hours to reach blastocyst stage compared to normospermic and TESE groups ($p=0.0009$). The rates of blastocyst formation were 70%, 35% and 27.8% in normospermic, TESE and MESA groups, respectively ($p=0.018$). Similar pregnancy rates were observed in TESE and normospermic groups (55%, 55%) but it was lower in MESA group (39%).

Discussion: We observed statistically significant differences in the development of embryos in which origins of sperm were different. As a result, MESA procedure in obstructive azoospermia become a highly controversial topic since the time needed to reach blastocyst stage is longer and rates of blastocysts and pregnancy are lower.

Key words: TESE, MESA, azoospermia, ICSI, time-lapse imaging system

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Son 15 yılda modern tıp alanında üreme tıbbına yönelik tedavide çok farklı değişiklikler eklenmiştir.İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tekniklerinin geliştirilmesi ile ileri derecede erkek faktörlü olgular ile *azoospermide* (semende sperm bulunmaması) tedavi seçenekleri ortaya çıkmıştır.*Obstrüktif azoospermi* ,ejekülasyon kanalında tıkanma veya vas deferens yokluğunda ortaya çıkmakta, genel olarak bu olguların bir kısmında epididimis'ten sperm aspirasyonu yapılmaktadır (MESA) (52,23). Öte yandan testiste sperm üretiminde bozukluklar sonucu oluşan azoospermi , *non obstrüktif* azoospermi diye adlandırılmakta ,bu olgularda genellikle testis dokusundan sperm elde edilme yöntemleri uygulanmaktadır (TESE)(21,51,55).

Sperm maturasyonu testiste gerçekleşmekte ve epididimiste tamamlanmaktadır. Spermiohistogenez esnasında sperm kromatini histondan protamine geçişi sağlamakta , morfolojik değişiklikleri içermektedir(47,64).Epididimal çevrede ise sperm hareket kazanmakta , 2-12 günlük süreçte kondanse olmuş kromatin'in stabilizasyonu sağlanmakta, plazma membran değişiklikleri ortaya çıkmakta,yeni yüzey proteinleri eklenmektedir(15).Genel kanı, epididimal spermelerin testiküler spermelere oranla daha matür ve fizyolojisini tamamlamış olduğudur.TESE veya MESA tekniği ile elde edilen spermeler ile ICSI uygulamasında kabul edilebilir oranda fertilizasyon ve embriyo gelişimi ile birlikte gebelikler elde edilmektedir(50).

İn vitro fertilizasyon laboratuvarında embriyo gelişiminin değerlendirilmesi belirli aralıklarla zigot ve bölünmelerin izlenmesi ile mümkündür.PH değişiklikleri ve sıcaklığın embriyo gelişimine negatif etkileri ,inkübatörden alınan embriyoların izlenmesinde ortaya çıkmaktadır(4,22).Sürekli embriyo izleme sistemi (EmbryoScope™) sıcaklık, pH değişimlerine ve dış etkenlere son derece hassas olan embriyonun inkübatör dışında kaldığı süreyi en aza indirmek için geliştirilmiştir(16,29).Bu sistemde 5 günlük gelişim süreci içinde embriyo izlenmekte, görüntü alınarak klivajlar ve blastomer simetrisi, asimetrisi, sayısı hesaplanabilmekte, klivaj süreleri gösterilmektedir. Bu süreç içinde her 20 dakikada bir görüntü alınarak embriyonun gelişim süreci geriye doğru da izlenebilmektedir.Bu sistemde en

fazla 13 embriyonun izlenmesi mümkün olmaktadır. Sistemde ikinci kutup cisminin atılışından itibaren, pronukleusların gelişimi, ilk klivaj, ikinci ve üçüncü klivaj aşamaları ,

morula ve blastokist süreleri hesaplanmaktadır(13,12,61). Embriyo gelişiminin zamanlaması ile ilgili çalışmalar son yıllarda üzerinde çalışılan konuların başında gelmektedir, araştırmacılar bu zamanlama ile normal veya anormal embriyoları bulmayı hedeflemektedir.Yapılan araştırmalar embriyo senkronizasyonunun implantasyon ile yakın ilişkisi olduğunu göstermiştir(61,62).Embriyoskopta kullanılan *time-lapse* görüntüleme programı görüntüleri kayıt edip birleştirdikten sonra video halinde bize sunabilmektedir. Bu şekilde geriye dönük olarak embriyonun bütün morfolojik değişimlerini izleyebilmekteyiz, bu da bize embriyo seçiminde oldukça yardımcı olmaktadır.

Embriyoların tüp bebek laboratuvarında geçirdikleri 5 gün sonunda amaç, normal ve anormal döllen embriyoları ayırtmak, embriyonun bölünme aşamalarını kontrol etmek, hızlı veya yavaş gelişen embriyoları takip ederek optimum hücre bölünmesi gösteren embriyoları belirlemek ve böylece transfer edilecek en iyi embriyoları seçme şansını arttırmaktır. Bu sistem dünyada pek çok ülkede kullanılmaya başlamıştır. İlk bulgular embriyoskop ile takip edilen embriyolarda % 15 daha fazla canlılık ve gebelik şansının %20 arttığını göstermektedir(28).

Sürekli embriyo izleme sistemi ile tüm gelişim süreçleri, embriyo gelişim hızı bölünme zamanları normal ve anormal gelişen embriyolarda incelenmiştir (63,33). Aynı zamanda bu sistem ile güvenilir embriyo seçim kriterleri de ortaya çıkarılmıştır (16,34). Meseguer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada retrospektif olarak incelenen 247 embriyoda 5 hücreye ulaşma zamanı, 3 hücreden 4 hücreye geçiş zamanı ve 2 hücreden 3 hücreye geçiş zamanı en önemli üç parametre olarak belirlenmiştir (38). Bu model blastosist oluşumu ve kalitesi ile de ilişkilendirilmiştir (17). Ovulasyon induksiyon protokolleri , embriyo kültür solüsyonları ve düşük veya yüksek oksijen oranlarının embriyonun bölünme zamanlarını etkilediği gösterilmiştir (11,35,42).

Yüksek lisans tezi olarak yapılmış olan kaynak taramasında genetik nedeni olmayan *obstrüktif* ve *non obstrüktif* azospermi olgularında TESE veya MESA işlemleri sonrası gelişen embriyoların sürekli embriyo izleme sistemindeki farklılıkları ile ilgili herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında retrospektif olarak Tese, Mesa ve ejakülat spermi kullanılmış olguların sürekli embriyo izleme yöntemi ile gelişen embriyolarının zamanlamalarının ve gebelik başarılarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BILGILER

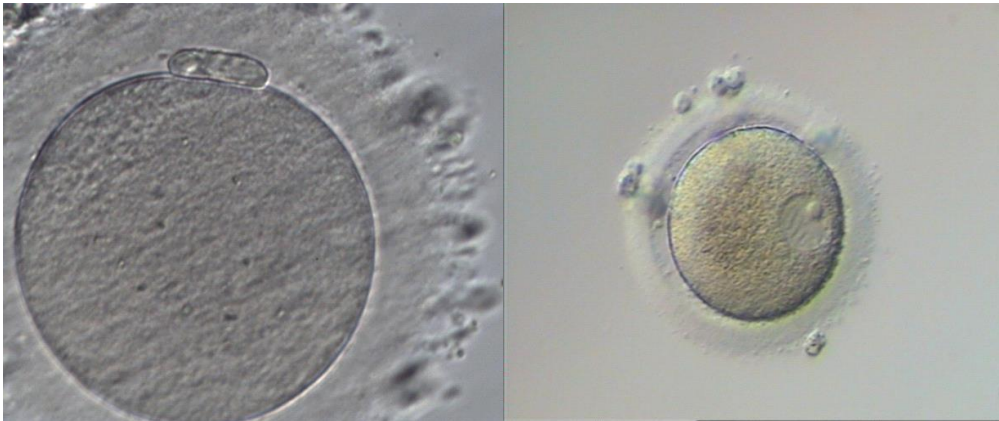
2.1.Oosit (Yumurta)gelişimive laboratuvarıda değeriendirilmesi

İnsan yaşamı erkek üreme hücresi sperm ile kadın üreme hücresi oositin (yumurta), zigot adı verilen , mitozı giden tek bir döllenmiş hücreyi oluşturmak üzere bir araya gelmesi ile başlar. Zigot anne ve babadan köken alan kromozom ve genleri taşıır ve meydana gelecek olan bireyin yaşamının başlangıcını oluşturur. Bu tek hücreli canlı daha sonra hücre bölünmesi, gelişim ve farklılaşma aşamalarından geçerek çok hücreli bir canlıya, insana dönüşmektedir. Döllenmeye hazırlık için gerek kadın gerekse erkek üreme hücrelerinde önceden birçok değişiklik meydana gelmektedir.



A

B



C

D

Resim 1:Memeli Oosit. A) Kümülüs oosit kompleksi , B) Metafaz 1 (M1) fazında oosit , C) Metafaz 2 (M2) fazında oosit , D) germinal vezikül (profaz I) aşamasında oosit.(Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)

Erkek ve kadın üreme hücreleri embriyonik gelişimin 3- 5. haftalarında primitif cinsiyet organlarına ulaşırlar. Genetik olarak dişi olan yumurtalıklarda ileride yumurtayı oluşturacak hücrelere (oogonyum), genetik olarak erkek(Y kromozomu taşıyan) olan testislerde ise ileride spermi oluşturacak hücrelere (spermatogonyum hücreleri) dönüşürler. Primordial germ hücreleri gonad taslaklarına ulaştıktan sonra önce farklılaşırlar sonra da bir seri mitoz bölünme ile çoğalırlar. Üçüncü ayın sonunda oogonyumlardan primer oositler oluşur. Primer oositler etrafındaki hücreler ile birlikte primordial folikül olarak adlandırılır. Oluşan primer oositler 1. mayoz bölünme dediğimiz bölünme sürecine girer. Ancak bu oositler puberte boyunca cinsel olgunluğa ve üreme siklusları başlayıncaya kadar mayoz bölünmenin Profaz aşamasında bekler. Kadınlarda doğumdan sonra yeni primer oosit oluşumu söz konusu değildir ve bu nedenle kadınlar yumurtalıklarında belirli oosit (yumurta) rezervi ile dünyaya gelmektedirler. Pubertede her iki yumurtalıkta yaklaşık 400.000 oosit mevcuttur. Puberte ile oositler primordial folikülden sekonder ve tersiyer foliküllere doğru gelişir. Her yeni siklusta salgılanan FSH etkisi ile 5-15 primordial folikül olgunlaşmaya başlar, büyüklüklerinde artış olur. Bir çok primordial folikül gelişmeye başlamakla birlikte genellikle sadece bir tanesi seçilerek tam olgunlaşma aşamasına ulaşır. Folikülün olgunlaşması ile folikül hücrelerinden salgılanan östrojenin etkisi ile LH salgılanması uyarılır ve primer oosit ilk mayoz bölünmesini tamamlar. Birbirine eşit olmayan 2 kardeş hücre oluşur. Sekonder oosit hemen hemen bütün sitoplazmayı alır, birinci kutup cisimciğine ise çok azı kalır. İlk kutup cisimciği küçük, işlevsel olmayan, kısa süre içinde dejenere olacak bir hücredir, oositi çevreleyen kabuk (zona pellusida) ile oosit zarı arasında yer alır. Ovulasyondan hemen sonra sekonder oositin çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye girer, bölünme durduğunda sadece metafaz aşamasına kadar ilerlemiştir. Eğer bir sperm sekonder oositin içine girerse, ikinci mayoz bölünme tamamlanır ve sitoplazmanın çoğu bu döllenmiş yumurta hücresine geçer. İkinci kutup cisimciği (polar body) atılır sonra oositin (yumurtanın) mayoz bölünmesi tamamlanır. Tüp bebek tedavisinde bu olgunlaşma süreçleri belirli ilaçlar kullanılarak başlatılmakta, hormon değerleri ve folikül boyutları ölçülerek kontrol edilmekte ve uygun boyutlara ulaştıklarında folikül çatlatma iğneleri verilerek son olgunlaşma süreçlerinin tamamlanması sağlanmaktadır. Olgunlaşma sürecini tamamlayan oositler

(yumurtalar) belirlenen saatte toplanır ve laboratuvarında embriyologlar tarafından değerlendirilir. Ancak olgun oositlere (Metafaz II aşamasında) işlem uygulanır (58)

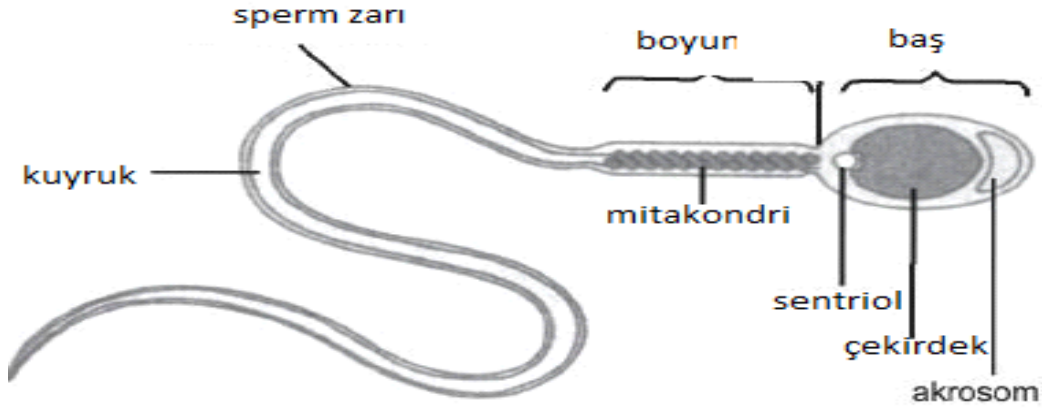
2.2 Spermatozoa

Spermatozoa baş, orta kısım ve kuyruk bölümlerinden oluşmaktadır. Baş bölgesinde nükleus ve akrozom olmak üzere iki kısım vardır ve her iki kısmın da plazma membranı ile çevrili olduğu bilinmektedir. Nükleus elips şeklinde yoğun bir yapıdadır ve uç kısmı akrozin, proteaz, hiyaluronidaz gibi hidrolitik enzimler içeren akrozom bölümünden oluşur. Akrozom bölgesi golgi kompleksinden gelişmiş ve içerdiği enzimlerin oositi çevreleyen korona radyata ve zona pellusida'dan spermatozoonun geçişini kolaylaştırdığı bilinir.

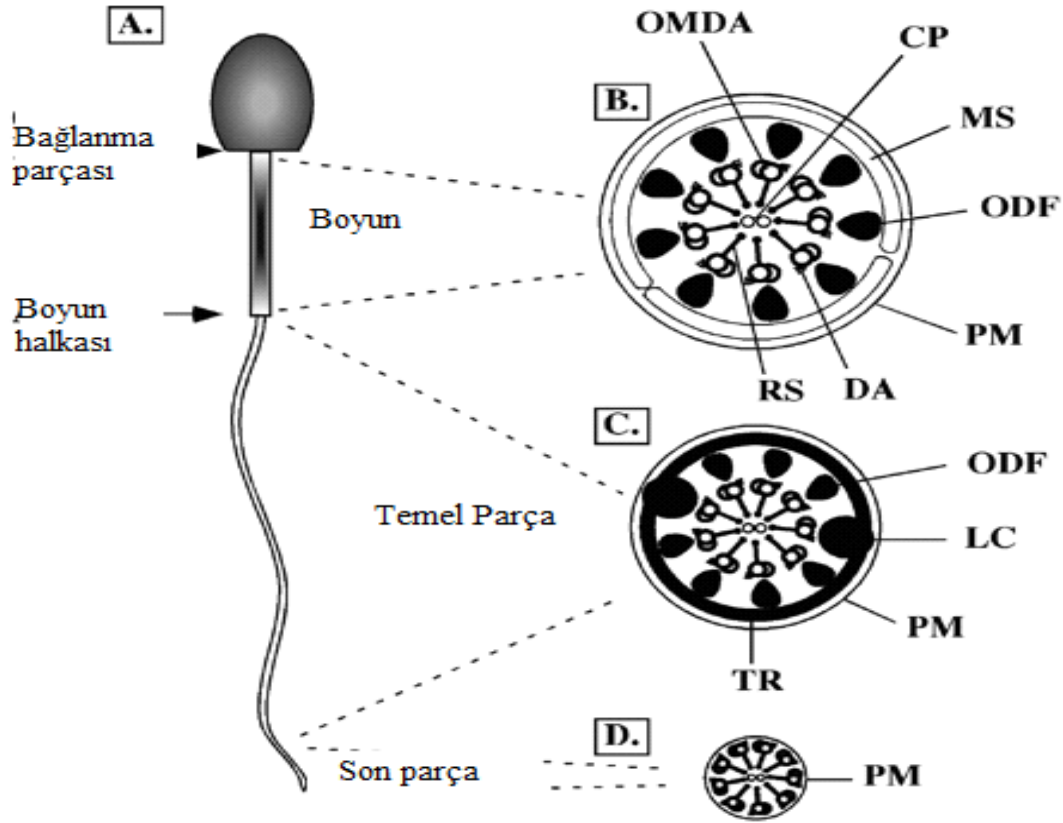
Spermatozoonun orta kısım bölgesi ise nükleusa bağlanmış proksimal sentriyol ve aksonem'e kaynaklık eden distal sentriyolden meydana gelmiştir (şekil 1).

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 kuyruğun santralini oluşturduğu bilinmektedir.

Annulus (son halka) mitokondriyon yapısının uç bölümünün altında yoğun bir halkadır ve orta parçanın esas parçaya dönüştüğü bölge olduğu bilinmektedir. Esas parça annulustan uzanır ve mitokondriyal sarmal içermez. Merkezi aksonem, dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıftan oluşur. Spermatozoon kuyruğu incelidikçe, dışta bulunan lifler ve fibröz yapı biter. Son parçanın, sadece plazma zarı ile sarılmış 9+2 mikrotübüler aksonemden oluştuğu bulunmuştur (Şekil 2) (24).

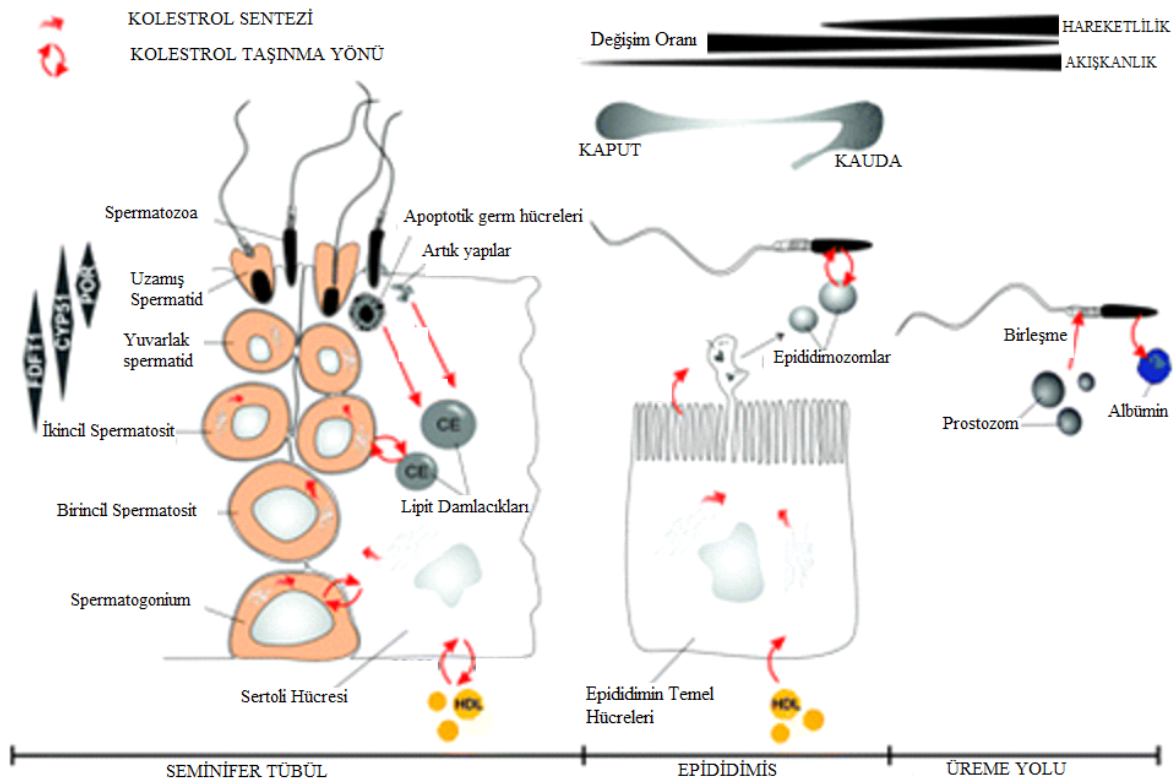


Şekil 1: spermatozoa çizim



Şekil 2: spermatozoa 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(57).

Spermilerin olgunlaşması testis ve epididimiste gerçekleşmektedir. Testis spermatogenez ve spermiohistogenez işlemlerinin gerçekleşmesinde, epididimis ise sperm DNA maturasyonu, kromatin kondansasyonu için son işlem olan protaminler arasındaki bağların güçlenmesi, membran maturasyonu, yüzey proteinlerinin eklenmesi ve fizyolojisinin tamamlanmasında, hareket kazanmasında önemli rol oynamaktadır(2). İnsanda spermilerin epididimisten geçiş süreleri diğer memelilere göre daha kısa olduğu (2-6 gün) gösterilmiştir(3). Epididimis testisten sonra spermilerin membran maturasyonu ve nükleusta bulunan DNA yapısını çevreleyen proteinlerin daha sıkı yapıya kavuşmasını, sperm hareket ve fizyolojisini tamamlama gibi görevleri üzerine alan, tubuler bir yapı ve morfolojik olarak apokrin salgı yapan, mikrovillüs taşıyan hücrelere sahiptir(53). Epididim hücrelerinden salgılanan proteinler spermatozoa membranları üzerine yerleşir, fertilizasyon ve sperm-oosit membranlarının füzyonunda görev alırlar(32,18). Üretilen ADAM ailesi proteinleri, Fertilin, cryestin, CE9, alfa mannosidase ve diğerleri sperm membranlarında yer alırlar. Sperm proteinleri epididim ortamından geçişte de glikolizasyon veya proteolitik işlemlere maruz kalarak değişiklik gösterirler.(14).



Şekil3: Sperm membran maturasyonunun testis ve epididimiste çizim ile gösterilmesi.

(Kaynak:Keber ve ark. 2014 American Society for Biochemistry and Molecular Biology,2014)(31)

2.3 Semen analizi

Ejakulat'tan sperm hazırlaması veya yıkaması tüp bebek işinde en önemli işlemlerden biridir.Doğru yapılmış ejakulat hazırlaması veya yıkaması IVF , İCSİ VE IUI 'da başarı şansını oldukça arttırır (41)ve İCSİ işleminde oldukça kolaylık sağlar.Ejakulatın yıkanıp hazırlanması için değişik yöntemler bulunmaktadır, bu yöntemlerden hangisinin tercih edileceği ise ejakulatta yapılan ilk inceleme belirgin olur,bu ilk incelemeye bazal değer denir.Kullanılacak yöntem hastalara göre değişebileceği gibi aynı hastanın farklı zamanlarda alınan örneklerindedede bu yöntemler değişebilir hangi yöntemin seçileceğide hastaya uygulanacak tedavi yöntemi belirgin rol oynar.örnek vermek gerekirse ;daha önce yapılmış olan sperm analizinde , hacmi ve konsantrasyonu yüksek bulunan bir ejakulatın IUI işlemi için tamamı kullanılırken İCSİ işlemi için küçük bir kısmı kullanılabilir.

Sperm hazırlama işleminde iki yöntem vardır ; Yıkama ve doğrudanyüzdürme yada yoğunluk sıralayıcısı (gradient) yöntemleri.Ejakulatın yıkanmasında farklıkültür solüsyonları kullanılabilir. HTF (human tubular fluid) solüsyonu bu amaçla kullanılmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütünün önerisine göre bir erkeğin semen profiline 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(60).

2.3.1 Yıkama ve doğrudan yüzdürme metodu

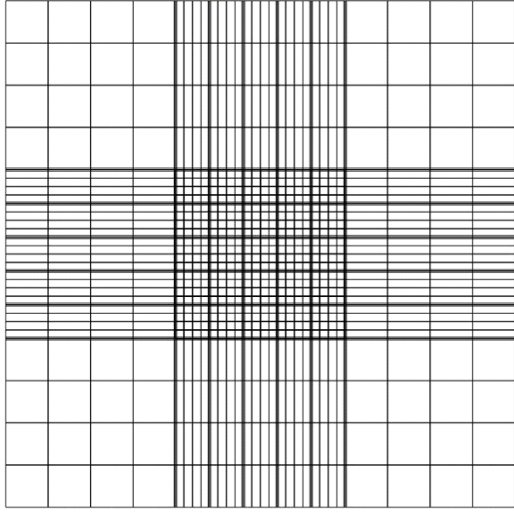
Semen 1,5 -2 kat volüm içerecek şekilde HTF solüsyonu ile karıştırılır. 1500 rpm de santrifüjlenir . Üstte kalan supernatan atılır ve işlem bir kez daha tekrarlanır. Supernatan üzerine 45 derecelik eğimle yavaşça HTF solüsyonu eklenir, 30-45 dakika sonra üst faza yüzen spermler alınarak kullanılır.

2.3.2 Yoğunluk sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi

Anormal spermiler ile ölü hücrelerin ara fazlarda kalabilmesi ve normal hareketli spermilerin dibe çökmesi prensipine dayanır. Gradient PVP ve silika partikülleri içeren sperm için fizyolojik sayılabilecek bir solüsyonda hazırlanmış değişik yoğunluktaki preparatlardır. Tabakalar hazırlanırken en yoğun olan her zaman en alta olacağından normal spermde santrifüj sırasında bu en yoğun tabakaya göç eder ve sediment oluşturur. Semende bulunan diğer bileşenler ve anormal spermiler yoğunluk farkından dolayı üstte kalır ve böylece sağlıklı sperm ejakulattan ayrılmış olur. Gradient yöntemi semende hareketli sperm/toplam sayı oranının düşük olduğu , sperm dışı hücre sayısının yüksek olduğu durumlarda , ve teratospermi olgularında özellikle kullanılmaktadır. Rutin kullanımda iki tabakalı gradient kullanımı yeterli olmaktadır. Gradient yöntemi mutlaka konik tabanlı tüp kullanarak yapılmalıdır. Gradientten süzülen sperm konik tüpün tabanında oluşturacağı çökelti böylece gözlenir.

Hastadan alınan örnek 60 dakika kadar oda ısısında sıvılaşmaya bırakılır. Semen bulunduğü kabın ağzı açık olmamalıdır. Bu süre zarfında arada sırada kap çalkalanıp ışığa tutularak sıvılaşp sıvılaşmadığı gözlenmelidir. Ejakulat tamamen sıvı hale gelmelidir ve içersinde lifimsi partüküller izlenmemelidir. Eğer 60 dk zarfında sıvılaşma olmadıysa dereceli pipet ile ejakulat yavaşça çekilip bırakılarak sıvılaşmasına yardımcı olunabilir. Ejakulat bu işlemlere rağmen sıvılaşmadıysa inkübatörde biraz bekletmek sıvılaşmayı kolaylaştırabilir. Bazen eğer ejakulat çok viskoz ise sıvılaşmayabilir. Böyle durumlarda ise ejakulat kabına bir miktar HEPES yada bikarbonat tamponlu medium eklenerek pipetleme işlemi tekrardan yapılabilir. Ejekulat'tan 2-3 ml gradyen katmanlarının üzerine yavaşça konur ve 1500 rpm de 10-15 dakika santrifüjlenir. Üst faz ve ara faz atılır, dipte kalan çökelti bırakılır. Çökelti üzerine 2 ml HTF solüsyonu konarak santrifüjleme tekrarlanır. Bu işlem iki kez yapılır. Yıkanmış spermilerin üzerine 0.5 ml HTF solüsyonu konarak sperm süspansiyonu elde edilir.

2.3.3 Sperm Dansitesi/konsantrasyonu ölçümü; Hemositometrik yöntem

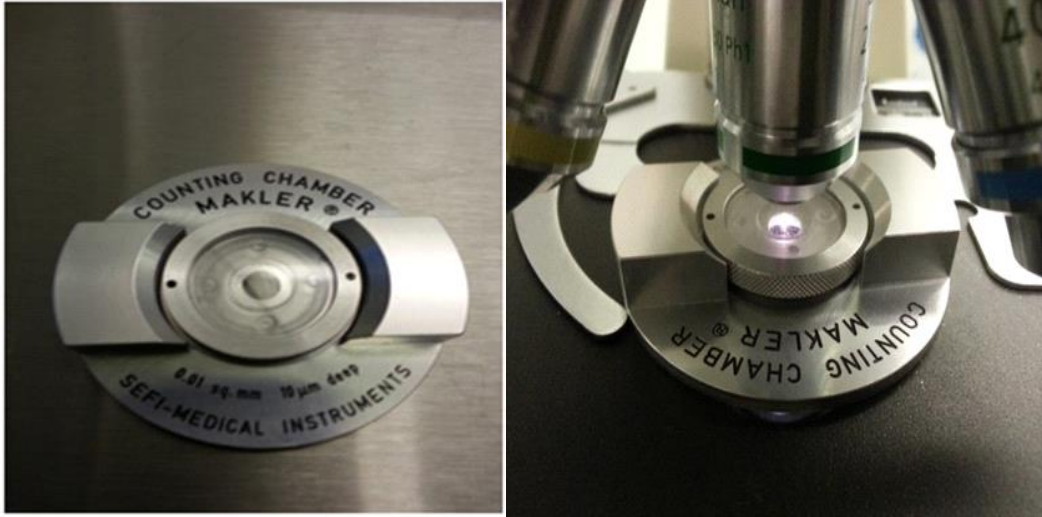


Şekil 4 : *Neubauer kamerasında sayma alanları*

10 µl semene 190 µl distile su veya metilen mavisi ile renklendirilmiş %1 lik formalin solüsyonu ilave edilir (X20 dilüsyon). Sayma kamarasına lamel kenarından 10 µl konur. 2-3 dakika yerleşmesi beklenir ve merkezdeki karelerden 5 kare (4 köşe 1 merkez) sayılır. Sayılan hücre $\times 10^6$ = sperm konsantrasyonu/ml bulunur.WHO 2010 kriterlerine göre semende bulunan spermelerin konsantrasyonlarının ölçümlerinde hemositometrik yöntemin tercih edilmesi önerilmektedir.

2.3.4 Sperm konsantrasyonunun Makler sayma kamarası ile ölçümü

4 mikrolitre semen Makler kamarasına (Resim 2.1) alınır.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,kaydedilir,daha sonra yerinde hareketli ve hareketsiz sperm sayılır.ve kayıt edilir.Sayım ne kadar gecikirse kamaranın periferinden o kadar çok sperm sayım sahasına yüzer ve yanlış sonuç verilir.



Resim 2. Makler kamarası (Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)

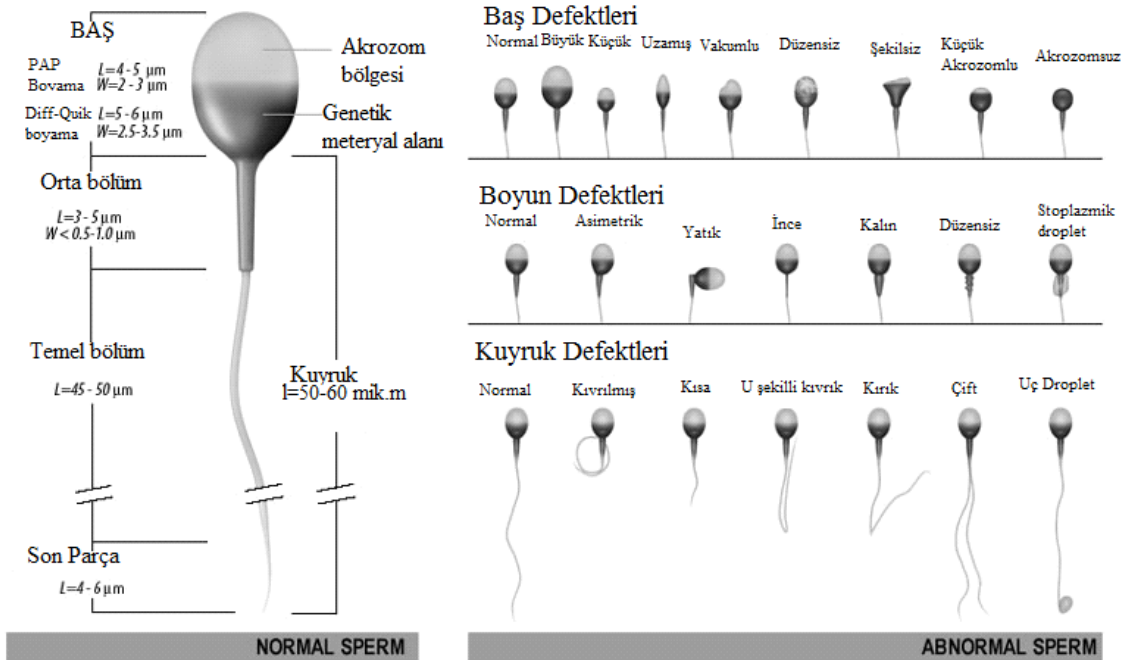
2.3.5 Kruger kriterlerine dayalı morfolojik (şekilsel) değerlendirme (WHO,2010)

Normal ve normale yakın morfolojiye sahip sperm hücrelerinin seçilmesi, infertilite tedavisinde son derece önemlidir. Semen morfolojik değerlendirmesinde Kruger kriterleri göz önünde bulundurulmaktadır. Bu kriterler ile baş, akrozom, çekirdek, boyun, kuyruk ve orta parça anormallikleri değerlendirilmektedir(36,37).Diff quick, hematoxylin veya giemsa boyaları ile boyanan spermler immersion objektifinde incelenir, akrozom ve nukleus anomalileri ile orta kısım ve kuyruk anomalileri sayılır, yaklaşık 200 sperm sayılarak normal morfoloji oranı elde edilir. 2010 dünya sağlık örgütü verilerine göre % 4 ve üzeri normal sperm taşıyan semen örnekleri morfolojik olarak normal kabul edilir.

Tablo1. Semen Analizi Kruger Kesin Kriterleri Dünya sağlık örgütü (WHO 2010)

Parametre	En düşük Referans
Semen volumü (ml)	1.5

Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15
Total sperm sayısı (10 ⁶ /ejakulat)	39
Progressive motilite (PR, %)	32
Total motilite (PR +NP, %)	40
Vitalite (canlı sperm, %)	58
Sperm morfolojisi (NF, %)	4
pH*	>/=7.2
Lökosit* (10 ⁶ /ml)	<1



Şekil 5. Kruger morfolojik kriterlerine göre sperm morfolojisi değerlendirilmesi (http://www.thebabystepsblog.com/2012_11_01_archive.html)

2.4 Azoospermi

Azoospermi meni örneğinde hiç sperm olmaması olarak tanımlanmaktadır. Genel populasyonun %1'inde ve infertil erkeklerin %10-15'inde azoospermiye rastlanmaktadır. Azoospermi genel olarak tıkanıklığa bağlı olan ve olmayan olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Tıkanıklığa bağlı azoospermi doğuştan sperm kanallarının bir bölümünün

eksikliği, genital enfeksiyonlar ve cerrahi girişimler sonrası gerçekleşebilir. Tıkanıklığa bağlı olmayan *azoospermiler* ise genetik bozukluklar, testislerin doğuştan yukarıda kanallarda kalması, testis torsiyonu, bazı enfeksiyonlar ve radyasyon gibi nedenlere bağlı olarak gelişebilir. Tıkanıklığa bağlı azoospermilerde kanalların açılması için bazı cerrahi girişimler denenebilir. Cerrahi girişim ile başarı elde edilmeyen hastalarda ve tıkanıklığa bağlı olmayan azoospermilerde tek tedavi yöntemi cerrahi yolla sperm elde edilmesi ve mikroenjeksiyon uygulanmasıdır. Tıkanıklığa bağlı olan hastalarda cerrahi yolla elde edilen spermle inseminasyon veya normal in vitro fertilizasyon uygulaması yapılmaktadır.

2.4.1 Tıkanıklığa Bağlı Azospermi:

Azoospermik erkeklerin yaklaşık %15-20 sinde obstrüksiyona bağlı nedenler olabilir (45). En sık karşılaşılan obstrüksiyon nedenleri epididim, vas deferens, ejakülatuar kanal obstrüksiyonları olarak görülür. Bu hastalarda bir iğne ile epididime girilerek (PESA), mikrocerrahi ile epididime girilerek (MESA), testise iğne ile girilerek (TESA) ve bu yöntemlerle sperm bulunmayan hastalarda testisten doku örnekleri alınarak (TESE) sperm elde edilebilir. Tıkanıklığa bağlı olan hastaların yaklaşık olarak hepsinde sperm bulunmaktadır. Epididimden sperm alınan, ancak hareketli sperm bulunmayan hastalardan testisten sperm alınması gerektiği konusunda araştırmacılar fikir birliği vardır.

Tıkanıklığa bağlı azoospermik erkeklerde sperm elde etme teknikleri genel olarak kapalı (perkütan) ve açık yöntemler olarak iki şekildedir. Kapalı yöntemlerde iğne yoluyla testise (TESA) girilerek sperm elde edilmesi veya epididime (PESA) iğne yoluyla girilerek sperm elde edilmesi yöntemi kullanılmaktadır. Kapalı yöntemlerin basit olması ve lokal anestezi ile kolaylıkla uygulanabilir olması gibi avantajlarının yanında, sayıca açık yöntemlere oranla az sperm elde edilmesi ve özellikle PESA'da spermilerin canlılığının ve hareketliliğinin düşük olması gibi dezavantajları vardır. Açık yöntemlerde testisten doku örneği alınarak (TESE)(Resim 3) veya epididimden operasyon mikroskobu aracılığı ile sperm aspirasyonu (MESA) yapılmaktadır.

2.4.1.1 MESA yöntemi

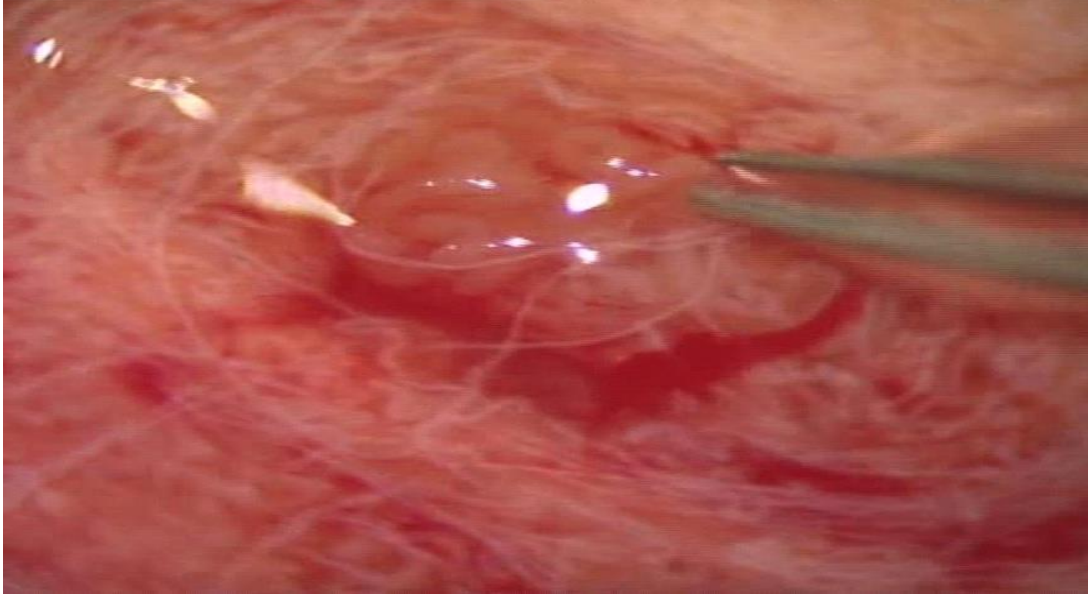
Obstrüktif azospermisi olan vakalarda kullanılan bir yöntemdir. Mikrocerrahi olarak epididimal sperm aspirasyonu temeline dayanır. Obstrüktif azospermili hastalarda epididime, mikroskop altında küçük bir cerrahi işlemle açılan kanaldan ince iğneyle girilerek aspirasyon yapılır; Enjektör içersine alınan sıvı androloji laboratuvarına getirilir. Gelen bu sıvıya önce makler kamerası ile incelenir ve sayı ile beraber hareketlilik değerleri verilir. Üroloğa gerekli bilgiler verildikten sonra eğer sayı ve hareketlilik yeterli ise normal sperm hazırlama prosedürü uygulanır ve icisi işlemi için hazırlık yapılır veya saklanması planlanıyorsa sperm dondurma işlemi uygulanır.

2.4.2 Tıkanıklığa Bağlı Olmayan Azospermi:

Azospermilerin %60'ı tıkanıklığa bağlı değildir. Bu hastalarda çocuk sahibi olmanın tek yolu cerrahi olarak testisten sperm alınması ve sonrasında mikroenjeksiyon uygulanmasıdır. Yapılan çalışmalarda bu grup hastaların yaklaşık olarak %50sinde cerrahi olarak sperm elde edilebildiği gösterilmiştir. Bu hastalarda testise iğne ile girilerek sperm elde edilebileceği gibi cerrahi olarak testisten biyopsiler alınarak sperm elde edilebilir. *Sertoli cell only* sendromu, germ hücre aplazisi veya matürasyon arresti gibi tanılarda bulma olasılığı daha düşüktür. Testis hacmi veya hormon düzeylerinin sperm bulma olasılığı üzerindeki etkisi oldukça sınırlıdır. Tıkanıklığa bağlı olmayan azospermik erkeklerde bazı genetik testlerin yapılması önerilmektedir. Bunun nedeni bu hastalarda bazı genetik bozukluklara daha sık rastlanmasıdır. Örneğin bu hastaların %10-20sinde somatik kromozom bozuklukları ve %5-10unda Y-kromozomunda kırıklara rastlanmaktadır. Y-kromozomunun AZFb bölgesinde veya AZFbölgeyide içeren daha geniş delesyonlarında cerrahi olarak sperm elde etme şansı yok denecek kadar az olduğu için, bu hastaları tedaviye alınmaması önerilmektedir. Testisten sperm alınması ve sonrasında mikroenjeksiyon uygulaması ile ilk gebelik 1994 yılında elde edilmiştir(50).

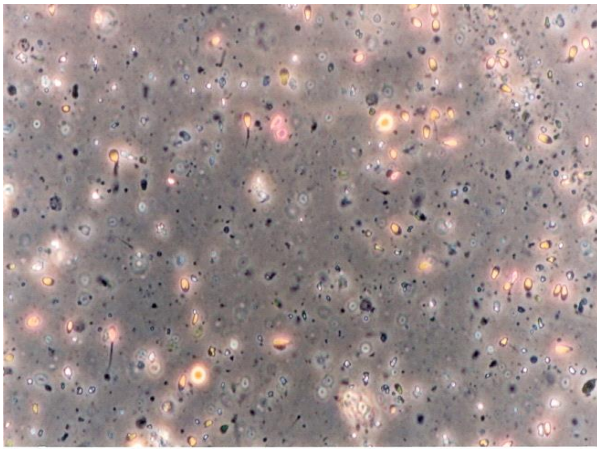
Mikro TESE mikroskop altında testisten biyopsi alınmasıdır. Burada amaç mikroskop altında dokunun büyütülerek sperm içermesi olasılığı yüksek olan dokuların alınmasıdır. Dolayısı ile teorik olarak sperm bulma olasılığı artarken, daha az doku alındığı için testise verilen hasar azalmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların büyük bir bölümünde mikroTESE ile sperm bulma oranının arttığı gösterilmekle birlikte, bazı çalışmalarda normal TESE ile arasında sperm bulma yönünden bir fark bulunmamıştır. Mikro TESE ile daha az testis dokusu alındığı ve bu nedenle testiste daha az zarar verildiği daha çok kabul edilmekle birlikte, sperm bulma olasılığı konusunda daha geniş çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Genel olarak TESE

uygulamalarında % 60 civarında sperm bulunabilmektedir. TESE ile elde edilen spermier sonraki mikroenjeksiyon işlemlerinde kullanilma amacı ile dondurularak saklanabilir.



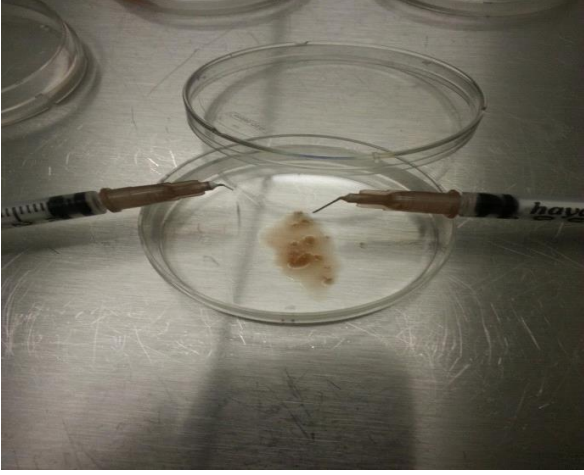
Resim 3 : Mikro tese ile testisten genişlemiş seminifer tubullerinin çıkarılması. Genişlemiş tubuller mikropansetle tutulur ve kesilerek alınır. (Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi Ameliyathane'sinde çekilmiştir)

Azospermi tanısı koymak için semen'in 1800xG de 5 dk lık santrüfjü ile İCSİ için gerekli olan spermier bulmamızı sağlayacaktır.



Resim 4: Perkütan sperm aspirasyonu ile elde edilen spermierin Eosin-Y ile boyanarak vitalitesinin incelenmesi. Alınan örnekte spermierin kuyruk yapısı tamamen kaybolmuş ve sadece baş olarak

kalmış ölü sperm (siyah oklar) ve kuyruk yapısı bozulmakta olan ölü sperm (kırmızı oklar) görülmektedir.



Resim 5. *Tese örneğinin disekte edildikten sonraki durumu ;tübüller parçalanmış.*

2.5 Testisten elde edilen dokularda sperm araştırılması:

Petri kabına 37 C’de EBSS ve albumin içeren medium içerisine testis dokuları biriktirilir. Bu dokular, içerisindeki hücreleri açığa çıkartmak üzere insülin enjektör uçları ve mikro penset ile ayrıştırılarak küçük parçalar haline getirilir (Resim 16). Ayrılan küçük doku parçacıklarını mediumun içinde homojen halde süspansiyon haline getirmek için ince uçlu pipetörden birkaç kez geçirilir. Süspansiyondan 10 µl örnek lam lamel arasına alınıp ışık mikroskopunda 200 büyütmede incelenir. Toplanan tüm örnekler aynı işlem uygulanır. Alınan örneklerde sperm görülmediği takdirde tüm süspansiyon RBC Lysis solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika beklenir. 2000 rpm de 30 dakika gradient solüsyonu ile ayrıştırılır. Elde edilen pellet yeni bir tüpe alınır ve fertilizasyon solüsyonu ile tekrar süspansiyon edilir. Bu süspansiyon 1600 rpm de 10 dakika tekrar santrifüj edilir. Tüpün üst kısmı atıldıktan sonra tekrar fertilizasyon solüsyonu eklenir ve petri kabına dökülerek 37 C’de 15 dakika beklenir. Invert mikroskopta 200 veya 400 büyütmede sperm araştırması yapılır. Bu yöntem ile bazal taramalarda sperm görülemeyen örneklerde, çok az sayıda olan spermeleri görmek ve ICSI için toplamak mümkün olabilir.

Taze elde edilmiş spermilerin veya dondurulmuş çözülmüş spermilerin hareketsiz oldukları durumlarda pentoksifilin (54)veya hipo-osmolik test (HOS) kullanılarak sperm canlılığı saptanabilir.

2.6 IMSI yöntemi

IMSI, intrasitoplazmik morfolojik sperm enjeksiyonu yöntemi olarak Benjamin Bartoov ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve yaklaşık olarak 6000 kez büyütme ile sperm başında nükleus yapısı ile ilgili detayları incelemeye yarıyan bir sperm seçim tekniğidir (6). IMSI tekniği standart in vitro fertilizasyon ve mikroenjeksiyon uygulamaları ile karşılaştırıldığında en üst düzeyde sperm morfolojik analizini yapabileme imkanı vermekte ve bu yapılan analiz ile canlı sperm hücresine hiçbir zarar verilmeden bu sperm mikroenjeksiyonunun yapılabilmesine izin vermektedir. Standart mikroenjeksiyon uygulamalarında canlı sperm hücresi en fazla 400×2 kat büyütülmektedir. Bu büyütmede sperm genel morfolojik özellikleri (baş yapısı, boyun yapısı ve kuyruk yapısı) incelenebilir. Fakat sperm hücresinin baş yapısında yer almakta olan organeller ve vakuol gibi olmaması gereken yapılar ve hücre çekirdeği incelenememektedir. Bu uygulama için ileri teknoloji ile donatılmış özel mikroskoplar kullanılmaktadır. IMSI tekniği kullanılarak yapılan işlemde 4800-6000 kat büyütülme kullanılarak canlı spermelerde hücre çekirdeği ve sitoplazma morfolojisi detaylı bir şekilde incelenmektedir. Bu şekilde normal ya da normale en yakın spermilerin ayrıntılı seçimleri sonrasında yapılan mikroenjeksiyon işlemi ile dölleme oranının % 25-40 civarında artırabildiği ileri sürülmektedir . IMSI ile seçilen spermilerin seçilmeyenlerle kıyaslandığında daha düşük DNA hasarı taşıdığı gösterilmiştir(9).



Resim 6: IMSI işlemi ile normal sperm seçimi (Fotograf Bahçeci sağlık grubu arşivinden alınmıştır x4800)

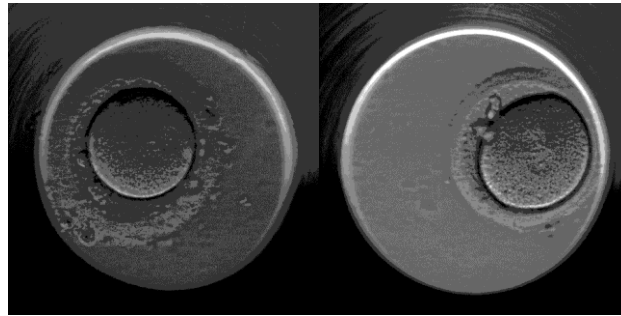
2.7 İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI tekniği, mikromaniplatör yardımı ile özel ısıtıcı donanıma sahip invert mikroskop tablası üzerinde steril cam mikropipetler yardımı ile spermın oositin sitoplazmasına enjekte edilmesiyle gerçekleştirilir. Mikroenjeksiyon işlemi için steril ve embriyo toksik olmayan özel petri kapları kullanılır, oositler için ve sperm için 25-30 µm lik damlacıklar oluşturulur ve üzeri yağ ile kaplanır. Sperm ve yumurta kendilerine ait yerlere konulduktan sonra mikroskop altında morfolojisi normal görünümlü ve varsa hareketli sperm seçilerek mikroenjeksiyon pipeti ile kuyruğun orta bölümüne bastırılarak hareketsizleştirilir. Kuyruk kısmından yakalanan sperm pipet içine alınarak yumurtanın içinde olduğu damlaya gidilir. Özel tutma pipeti ile sabitlenen yumurtanın içine hareketsizleştirilen sperm enjekte edilir. Bu işlem tüm yumurtalara aynı sıra ile uygulanır. İşlem bittikten sonra yumurtalar özel besi ortamlarına alınarak işlemden 16-18 saat sonra döllenme kontrolü yapılır(44).

2.8 Kültür ortamında Embriyo gelişimi

Döllenme gerçekleşikten sonra, tek faz veya iki fazlı kültür ortamlarında embriyo gelişimi takip edilerek uygun olan günde transfer işlemi gerçekleştirilir. Transfer günü, yumurta sayısı ve gelişen embriyo kalitesine göre belirlenir.

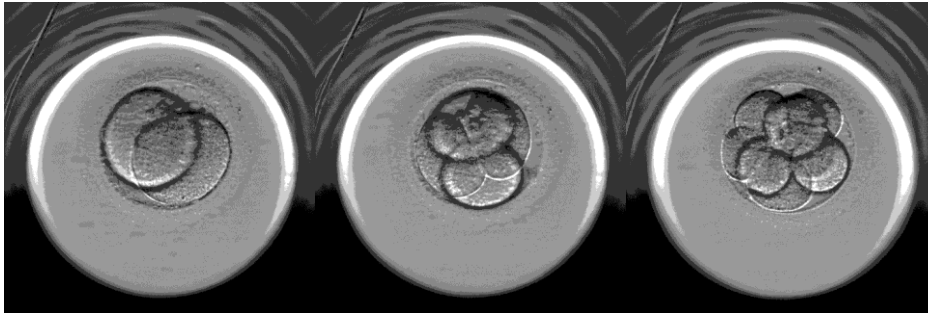
Döllenme kontrolü, IVF veya mikroenjeksiyon işleminden 16-18 saat sonra yapılır. Döllenme, dişi ve erkek hücrelerinin nukleuslarının birleşmesi sonucu ortaya çıkar (Resim 7). Fertilizasyonun normal kabul edilebilmesi için 2 pronükleus ve birinci ve ikinci kutup cisimcikleri gözlenmesi gereklidir. Pronükleus evresinde değerlendirme ,PN boyutu , büyüklük farklılıkları, nukleolar öncü cisimciklerin sayı ve simetrisi , sitoplazmik halo varlığı dikkate alınır.



Resim 7: İki pronükleus gözlenen normal döllenmiş zigot (Fotograf Bahçeci sağlık grubu arşivinden alınmıştır x4800)

2.8.1 Bölünme Evresi Sınıflaması

Döllenmeden sonra yumurta yaklaşık 25-30 saat sonra ilk mitotik bölünmeye başlayarak iki hücreli embriyo gelişmektedir. Embriyolar blastomer boyutları ve simetrisi, fragmentasyon yüzdesi ve her blastomerdeki fazla nukleus varlığı (multinukleasyon) gibi parametreler açısından değerlendirilir. Bölünme zamanlamasına göre embriyonun sahip olduğu blastomer sayısı şayet günün beklenen limitleri arasında ise normal gelişen bir embriyo, eğer bu sayı düşükse yavaş gelişen bir embriyo olarak değerlendirilir. Normal kabul edilen embriyo 25-30. saatte iki hücre, 38-40. saatte (2. Gün) üç-dört hücre, 54-60. Saatte (3. Gün) altı-sekiz hücre ve 4. günde birleşme işaretlerine bağlı olarak on ve üzerinde hücreye sahip olan, kompakt embriyodur. Kalite değerlendirmesine göre ise eşit büyüklükte blastomer yapısına sahip olan, % 0-5 arasında fragmentasyon içeren ve sitoplazmasında belirgin granüler yapı gözlenmeyen embriyolar "1.kalite" olarak değerlendirilirler(Resim 8). Bu değerlendirmeye göre kalite aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi olmaktadır (Tablo 2).



A

B

C

Resim 8: Bölünme evresinde 1. kalite embriyolar; A. 22. saatte 2 hücreli embriyo B. 44. saatte 4 hücreli embriyo C. 72. saatte 8 hücreli embriyo (Fotoğraflar Bahçeci Tüp Bebek Merkezinde çekilmiştir).

Tablo 2: Bölünme evresinde embriyo sınıflaması(1)

1. kalite	Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, granülasyon göstermeyen ,%0-5 oranında fragmentasyon içeren embriyo.
2. kalite	Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, %5-10 oranında fragmentasyon içeren veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
3. kalite	Blastomerler birbirinden hafifçe farklı, %10 üzerinde fragmentasyona sahip veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo.
4. kalite	Blastomer sayısı net sayılamayan, %30'dan fazla fragmentasyona sahip, blastomerler birbirinden belirgin derecede farklı veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo.

2.8.2 Erken embriyogenezde ileri dönem (4-6. Günler)

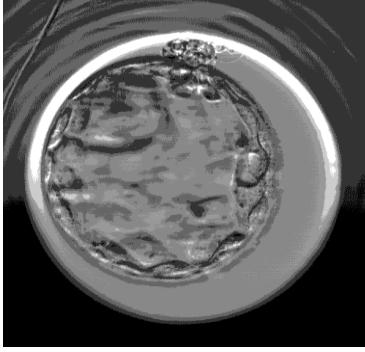
4. günde yaklaşık olarak fertilizasyondan 96 saat sonra gelişen embriyodaki hücre sayısı 16–20 hücre arasındadır. Bu aşamada kompakt yapı ortaya çıkar, hücreler arası bağlantılar artar, embriyonun farklılaşma aşaması olarak değerlendirilir. Bu aşama insan embriyosunda Morula diye isimlendirilir. Morulayı takiben erken ve geç kavitasyon dönemi başlar ve Blastokist gelişimi 5-6. Günlerde tamamlanır.



a



b



c



d

Resim 9: 4. - 6. günlerde embriyolar; a. kompakt morula b. Erken Blastokist aşaması c. Blastokist aşaması d. zona pellusida'dan çıkmış blastokist (Fotoğraflar Bahçeci Tüp Bebek Merkezinde çekilmiştir)

1. kalite	Erken blastosist, kavitasyon gözlenen ya da morula olmuş ve fragmantasyon, vakuolizasyon gibi anomali içermeyen embriyo.
2. kalite	Morula veya birleşmiş embriyo morfolojisine sahip en az bir anomalinin eşlik ettiği embriyo.
3. kalite	Morula veya birleşmiş embriyo morfolojisine sahip iki-üç anomalinin eşlik ettiği veya on hücre ve üzeri blastomer sayısına sahip birleşmeye başlamış embriyo.
4. kalite	Blastomer sayısı on veya daha az sayıda olan herhangi bir birleşme bulgusu gözlenmeyen embriyo.

Tablo 3: Embriyo gelişiminin 4. gününde sınıflama (1).

2.8.3 Blastokist skorlaması (2010)

Tablo 4: İç hücre kitlesi skorlaması

A	Sıkı paket halinde çok hücre içermesi
B	Gevşek, çok sayıda hücre içermesi
C	Çok az sayıda hücre içermesi

Tablo 5: Trofoektoderm skorlaması

A	Birbirine sıkıca bağlı birçok hücreden oluşan epitel yapısının bulunması
B	Daha gevşek bağlı ve birkaç hücreden oluşan epitel yapısının bulunması
C	Çok az ve büyük hücrelerden oluşan epitel yapısının bulunması

2.9 EMBRİYOSKOP (Embryoscope)

2.9.1 Embriyo gelişiminin canlı olarak izlenmesi ve inkübasyonu (zamana bağlı morfokinetik inceleme)

Tedavi sırasında elde edilen embriyolar CO2 inkübatöründe takip edilirler. Laboratuarda tutuldukları süre içerisinde gerek embriyo gelişimini izlemek gerekse gebelik şansı en yüksek embriyoyu seçmek için gelişim günlerinde embriyolar bu cihazlardan alınarak dış ortama çıkarılır ve mikroskop altında özellikleri incelenir. Bu işlemler her ne kadar laboratuvar şartlarında gerçekleştiriliyor olsa da embriyoların dış ortamdaki kontrolleri sırasında zarar görme ve gelişimlerinin etkilenme olasılıkları yüksektir. Son dönemde geliştirilen

embriyoskop diye isimlendirilen cihazlar ile embriyolar takip edilmekte , böylece embriyoların gelişimlerinin her 20 dakikası kayıt edilerek ,tüm gelişim süreci incelenebilmektedir.



Resim 10: EmbryoScope embriyo izleme sistemi: ekran ve inkübatör(Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)

Embryoscope cihazının embriyoların canlı olarak görüntülenmesinin yanında iki temel avantajı daha vardır:

- Görüntülenme sürecinde embriyolar kısa süreliğine dahi olsa cihaz dışına çıkarılmadıklarından embriyolar için dış ortamdan etkilenmeyecekleri güvenli bir “canlı inkübatör” ortamı sağlar; böylece gelişmekte olan embriyo olumsuz büyüme koşullarına veya sıcaklığa maruz kalmadan tüm gözlemler inkübatör içinde gerçekleştirilir.
- Hastaların ve sahip oldukları tüm embriyoların gelişimlerine ait verilerin saklandığı ve analiz edildiği bir bilgi işlem ünitesi olarak görev yapar. Bu sayede de embriyo görüntüleri ve inkübasyon koşulları hakkında ayrıntılı bilgiler işlenir, tedavi sonuçları bu verilere göre yorumlanır ve gelecekte referans için hasta veri dosyalarında saklanırlar. Bu özellikleri sayesinde, hasta profiline göre değişmekle birlikte geleneksel inkübatörlere kıyasla Embryoskop sistemi ile daha yüksek gebelik oranları sağlanabilmektedir.

2.9.2 Embriyoskop cihazının özellikleri

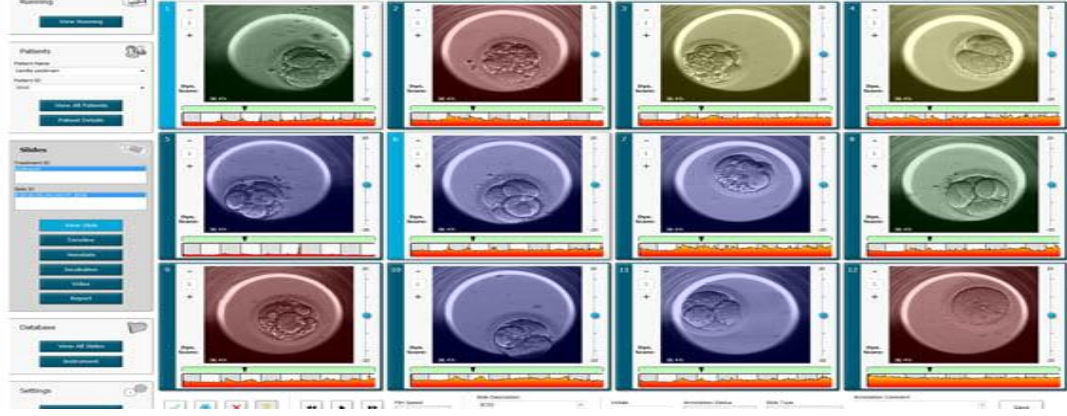
Embryoscope cihazı , gelişimleri sırasında tek tek embriyolar üzerinde bir dizi gözetimsiz ölçüm gerçekleştiren bir üç gazlı inkübatördür.Ölçümler şunları içerir : Çoku odak düzlemlerinde hızlandırılmış mikroskopi ve inkübasyon koşullarının kayıt edilmesi.İnkübasyon ortamlarını kontrol etmeye yönelik ayrı işlemci birimleri ve veri toplama

, güvenli ve güvenilir bir çalışma sağlar. Embriyoskop cihazı , embriyo güvenlik alanı (embriyo bölmesi) ve elektronik bileşenler için olan alanlar şeklinde ayrılmıştır. Embriyoskop cihazına *embriyoslide* denilen ,12 ayrı embriyonun inkübasyonu için 12 kuyuya sahip geniş bir yağ haznesi bulunan slaytlardır. Her bir kuyunun 25 mikrolitre ‘lik bir hacmi vardır. Her bir kuyunun iç kısmında , embriyoların bulunduğu merkezi bir çukur mevcuttur, yaklaşık olarak 250 mikrometrelik bir çapa sahiptir. Cihazın içerisinde bulunan kamera, embriyoların sürekli izlenmesine imkân vermektedir. Embriyo gelişimini etkilemeyecek düşük enerjili kırmızı ışık yardımıyla her 20 dakikada bir embriyoların farklı düzlemlerde fotoğrafları çekilmekte ve bunlar daha sonra hızlandırılmış video görüntüsü olarak izlenebilmektedir. Hasta başına 12 embriyonun eşzamanlı olarak gelişimlerinin takip edilebilmesini sağlayan bu sistem, gebelik oluşturabilecek embriyonun seçilmesinde günüyle uyumlu bölünmeleri ve kalitelerinin yanı sıra tüm gelişim süreçlerinin de bir seçim kriteri olarak eklenmesini sağlamıştır.

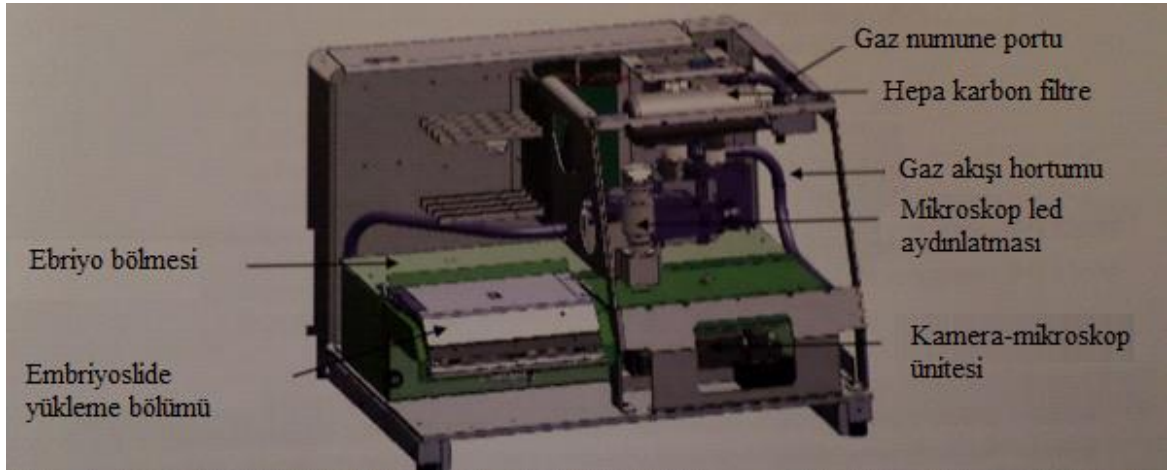
Embriyo değerlendirmesinde kullanılan tüm konvansiyonel kriterlerin yanında EmbryoScope “time-lapse” ya da hızlandırılmış görüntüler yeni değerlendirme kriterlerinin oluşmasını da mümkün kılmıştır. Bunlar aşağıda belirtilmiştir.

- Çekirdeklerin oluşum zamanları
- Döllenmeden sonra çekirdeklerin silinmesi
- İlk ve sonraki klivajların kesin zamanının belirlenmesi
- İlk bölünmeden sonra çekirdeklerin görülmesi
- Hücre bölünmelerinin senkron ve asenkron olarak takibi
- Embriyo fragmentasyon geçmişi
- Blastosöl boşluğunun oluşum zamanı
- Tofektoderm hücrelerinin zonaya yaptıkları ilk bası zamanı

Hızlandırılmış “time-lapse” görüntü, embriyoların dinamik gözlemini sağlayarak gebeliği oluşturacak doğru embriyonun seçiminde yardımcı bir yöntem olarak seçkin IVF laboratuvarlarında yerini almıştır. Embriyoların laboratuvar ortamında, kültür şartlarını bozmadan, sürekli takibini sağlayan EmbryoScope sisteminin IVF laboratuvarlarında insan embriyo kültürü için kullanımını dünya çapında ağırlığı olan Amerikan FDA kuruluşu onaylamıştır



Resim 11:Embriyoskopta bir hastaya ait toplu görüntüleme ekranı(Fotoğraf Bahçeci Tiıp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)



Şekil 6:EmbryoScope cihazı bölmeleri

Entegre mikroskop ,embriyo güvenlik alanının dışına yerleştirilmiş ayrı bir ünedir.Mikroskop , bir led aydınlatma ünitesi ve bir mikroskop /kamera ünitesinden oluşur.Sistem,yukarıdan aydınlatmalı ve incelenen embriyoların alt kısmına yerleştirilen bir objektif aracılığıyla yapılan gözlem gibi özelliklere sahip bir normal invert mikroskoba karşılık gelmektedir.Her biri 12 embriyo içeren 6 adet embriyoslid e cihazı,yani toplamda 72 embriyo içeren sıcaklık aralığı 35 °C ile 45° C arası ayarlanabilen, 30 saniyelğine yüklem e kapısının açılmasının ardından sıcaklık için düzelme süresi <10 dk olan 30 saniyelğine yüklem e kapısının açılmasının ardından sıcaklık doğrulaması <0.5° C olan, CO2 aralığı :% 2-10 % arasında, CO2 doğruluğu : % +/- 0.2 , % 5 CO2 'de CO2 tüketimi :<1 L/sa dir. 30 saniye yüklem e kapısının açık kalmasından sonra CO2 konsantrasyonu için düzelme süresi <5

dk 'dır. O₂ aralığı : 5-20% dir. O₂ doğruluğu : +/-0.3% tür. % 5 O₂ de N₂ tüketimi : <20 L/sa tir. 30 saniyeliğine yükleme kapısının açık kalmasının ardından O₂ konsantrasyonu için düzeltme süresi <15 dk dır.Embriyo görüntü alımı 1280 x1024 piksel monokrom CCD kameraya sahiptir.mikrometre başına 3 piksellik bir çözünürlük sağlayan yüksek kaliteli 20x,0.40 LWD Hoffman Modulation kontrast objektifi vardır. Aydınlatma tek kırmızı LED kullanılmıştır.Embriyo başına günlük toplam ışık pozlama süresi <50 saniyedir.Görüntüler , 500 x 500 piksellik bir çözünürlükle depolanır

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmaya alınan gruplar ve özellikleri

Bu çalışma; ocak 2011 yılı ile şubat 2014 yılı arasında Bahçeci Fulya Kadın Sağlığı Merkezine infertilite problemi ile başvuranve ICSI uygulaması yapılmış ve embryoskopta morfokinetik takipleri yapılmış olan 58 hastadan alınan verilerin retrospektif incelemesini içermektedir.Toplanan yumurtalara MESA,TESE ve ejakulat yöntemi ile elde edilen spermeler

ile geliştirilen embriyoların Embriyoskopta alınmış görüntüleri, ve embriyoskop zamanlaması üzerinde çalışma gerçekleştirilmiştir.

Dosya incelemesi yapılan hastalar Bahçeci Fulya Kadın Sağlığı merkezine ,tüp bebek tedavisi için başvuran hastalar arasından seçilmiştir.Bu çalışmaya bilinen bir kadın faktörü bulunan, PCO ve endometriosis olguları dahil edilmemiştir.İnfertilite nedeni sperm faktörü olan hastalar çalışmaya alınmıştır.Ayrıca ,Hormon profilleri ;FSH , LH ,Estradiol (E2) ve Prolaktin hormon düzeyleri normal olan 18 ile 36 yaş arası ve OPU (oosit toplama) işlemi sonrası 5 ile 15 yumurta elde edilmiş sağlıklı görülen kadınlar çalışmaya alınmıştır.Çalışma üç grup altında incelenmiştir . Kontrol grubu olarak hem kadın hem de erkekte belirli bir problem görülmeyen yani açıklanamayan infertiliteli hastalar alınmıştır.Olguların tümünde İCSI yöntemi uygulanmış, bunlardan gelişen embriyolar bir sürekli embriyo izleme sistemi olan Embriyoskop inkübatöründe (Unisense Fertiliteltech,Aarhus,Danimarka) takip edilip transferleri yapılmıştır.Çalışmamız kapsamında geriye yönelik bu verileri inceleyerek bölünme zamanları ve bununla ilişkili olarak gebelik sonuçlarını normospermi, TESE ve MESA gruplarında araştırılmıştır.

1.Grup : İnfertilite nedeni *non obstrüktif* azospermi olup mikro tese (testiküler sperm ekstraksiyonu) işlemi ile sperm elde edilmiş ve İCSİ işlemi yapılmış 20 hastadan oluşmaktadır.

2.Grup : İnfertilite nedeni ; *obstrüktif* azospermi olup MESA (Micro-Epididymal Sperm Aspiration) işlemi ile sperm elde edilmiş ve İCSİ işlemi uygulanmış 20 hastadan oluşmaktadır.

3.Grup : Açıklanamayan infertiliteli ,sperm parametreleri normal , bilinen herhangi bir infertiliteye neden olabilecek problemi olmayan hastalar .Sperm konsantrasyonu 20 milyon/ml , motilite (a+b) % 50 ve üzeri olan,morfolojileri kruger kriterlerine göre % 4 ve üzeri olan ve cinsel perhiz süresi 3-5 gün olanlar çalışmaya alınmıştır.

Çalışmamız Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik kurulu tarafından 25.03.2014 tarihinde onaylanmıştır.

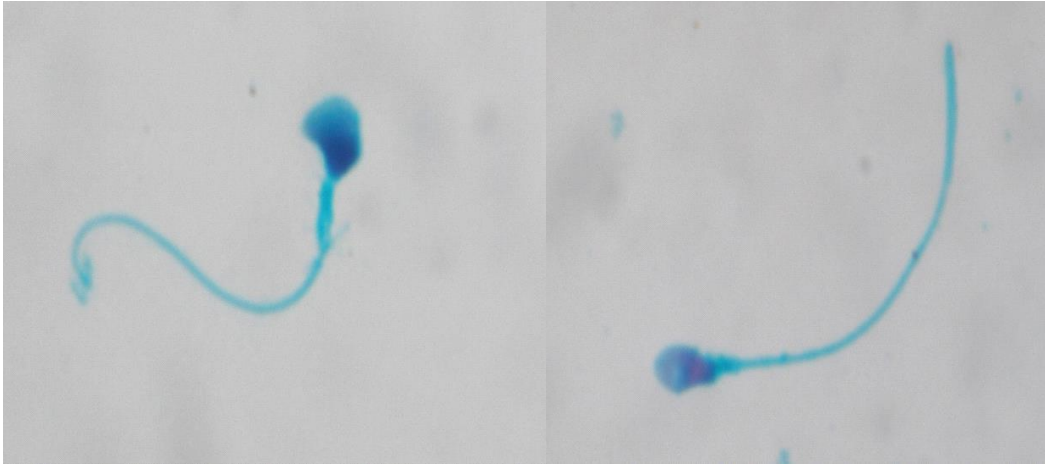
3.2 Semen analizi Uygulaması

Laboratuvara gelen örnekler semen volümü, viskozitesi, pH'ı açısından değerlendirildikten sonra morfolojik değerlendirme için preparat yapıp diffQuick boyası ile boyandı. Sperm

morfolojisi Kruger's strict kriterlerine göre değerlendirildi (60). Sıvılaşma sonrası sperm motilitesi değerlendirildi ve normal sınırlarda bulunan örneklerin embriyo gelişimleri değerlendirmeye alındı.



Resim 12: *Kruger strict* boyama ile elde edilmiş normal morfolojik yapıya sahip spermatozoolar(40X)(Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)



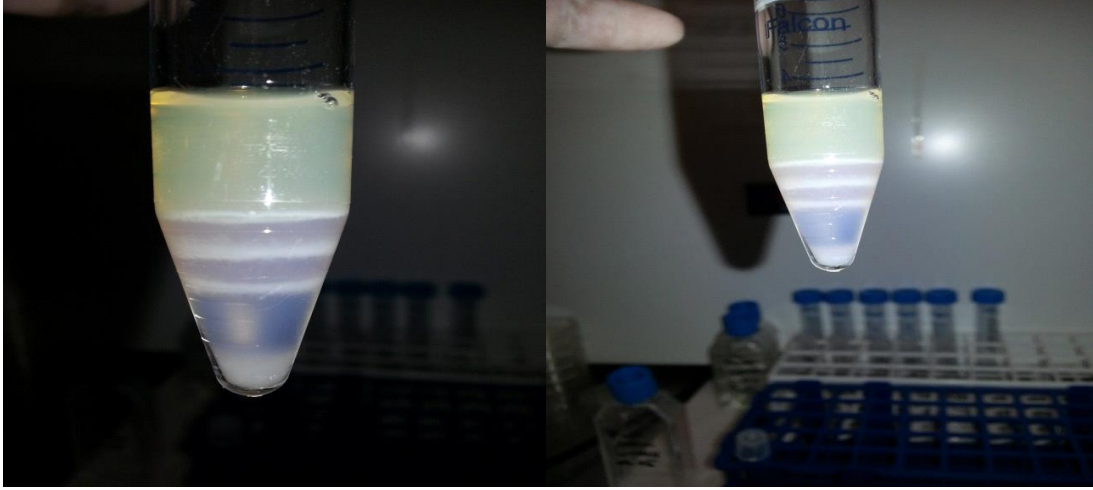
Resim 13: *Akrozomal Şekil Bozukluğu* (Diff quick boyama ile, fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir ,40X)



Resim 14: *Boyun dropletleri (siyah oklar) (Diff quick boyama yöntemi ile)(Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir,100X)*

3.2.1 Yoğunluk sıralayıcısı ,Gradient, hazırlama işlemi

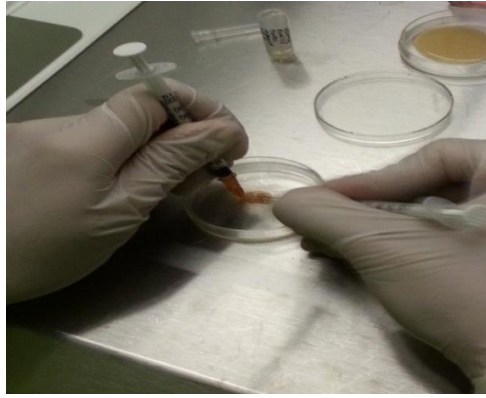
Sperm odasından gelen steril sperm toplama kabına alınmış olan ejakülat likifiye olduktan sonra yoğunluk sıralayıcısı (gradyent) yöntemi ile İCSİ işlemi için hazırlandı. *Pure sperm* solüsyonu ile sperm yıkama solüsyonu konik tüplere % 90 , % 50 ve % 70 oranında hazırlanıp en yoğun katman altta olacak şekilde yerleştirildi. Ardından üzerlerine 1.5 ml likifiye olmuş ejakulat steril cam pipet ile konik tüp 45 derecelik açıyla tutularak gradienti bozmadan yavaşça kondu ve 2000 rpm de 20 dakika santrüfuj edildi ve fazlar oluşturuldu. Santrüfuj sonrası oluşan pellet üzerine 0.5 ml HTF solüsyonu konarak sperm süspansiyonu elde edildi, steril cam pipetle çekilip 2001 kodlu tüpe kondu 1500 rpm de 5 dk santrüfuj edildi. Tüpün dibinde 0.5 ml pellet kalıncaya kadar süpernatant döküldü. 150270 kodlu petriye 50 µl damlacık dökülüp üzeri yağ ile kaplandı ve böylece icisi işlemi için hazır hale getirildi.



Resim 15: Yoğunluk sıralayıcı katmanları (Gradient) 2000 rpm de 20 dk santrüfuj sonrası (Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)

3.2.2 TESE Materyelinden İCSİ işlemi için sperm hazırlanması

Mikro tese işlemi ile elde edilen parçalar 150270 kodlu petri kaplarına alındı. Alınan bu parçalar steril insülin enjektörü ile parçalandı, sonra bu parçalar sperm yıkama solüsyonu ile karıştırılıp konik tüplere konuldu ve üzerine RBC lizis solüsyonundan kırmızı rengi kaybolana kadar ilave edildi ve 30 dk etüvde bırakıldı. 30 dk sonunda *isolate* % 50 lik gradient solüsyonundan tüpün dibine steril cam pipetle 0.3 ml ve altına % 90 lık *isolate gradient* solüsyonundan 0.3 ml yavaş bir şekilde gradienti bozmadan kondu ve 1800 rpm de 20 dk santrüfuj edildi. Konik tüpün dibinden pellet alınıp 2001 kodlu tüpe aktarıldı, üzerine 3 ml sperm yıkama solüsyonu konularak 1500 rpm de 5 dk santrüfuj edildi, bu işlem 2 defa tekrarlandı. Tüpün dibinde 0.5 ml pellet kalacak şekilde süpernatant döküldü. Tüpün dibinde kalan pellet 150270 petri kabına alınarak toplama kabı olarak icsi işlemi için hazır hale getirildi.



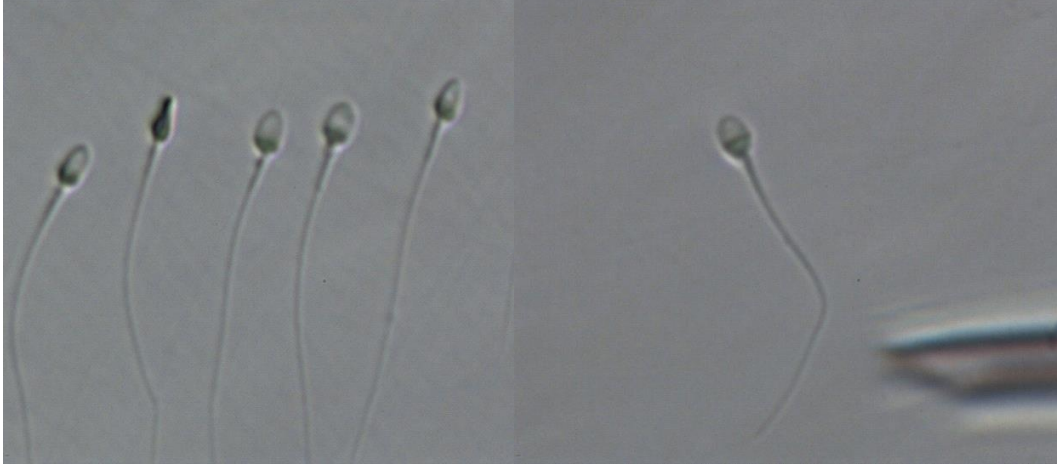
Resim 16 : *Tese örneklerinin parçalanması (diseksiyonu)Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)*

3.2.3 MESA Metaryelinden İCSİ işlemi için sperm hazırlanması

Mesa işlemi ile elde edilen sıvı haldeki örnek steril enjektör içinde laboratuvara geldikten sonra öncelikle makler kamarasında bakılır ve konsantrasyon değerlendirmesi yapıp not alındı. 5 ml % 50'lik ve 0.5 ml % 90 lık *isolate gradient* solüsyonu ile hazırlanmış 2 li gradient üzerine yavaşça bırakılan mesa sıvısı 2500rpm de 20 dk santrüfuj edildi.santrüfuj sonrası pellet steril cam pipetle dipten yavaşça çekildi ve 2001 kodlu tüpe konup üzerine sperm yıkama solüsyonundan 3 ml konuldu ve 1500 rpm de 5 dk santrüfuj edildi . Süpernatant atılıp dipte 0.5 ml kalacak şekilde bırakıldı.Kalan 0.5 lik sıvıdan IMSI seçimi için petri hazırlandı.

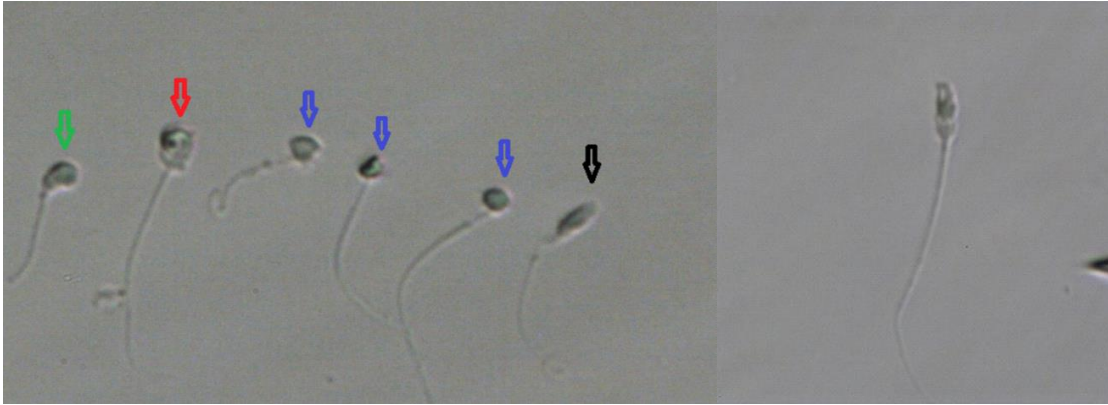
3.3 İMSİ İŞLEMİ

İMSİ (İntra cytoplasmic Morphologically Selected sperm İnjection) tekniği ile elde edilmiş ve ICSI uygulaması için hazırlanmış spermier yüksek büyütmede nomarski objektifleri altında seçildi ve 1 küçük vakoul taşıyan veya hiç vakoul taşımayan normal spermier seçildi.Hazırlanan spermier İMSİ seçimi sonrası 25 °C de üzerleri kültür yağı ile kaplanarak İCSİ saatine kadar bekletildiler.



Resim 17: İMSİ işlemi ile seçilmiş normal morfolojiye sahip spermatozoonlar.40X)

(Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir)



Resim 18: İMSİ işlemi ile seçilmiş anormal başlı spermier (yeşil ok ;amorfe baş,kırmızı ok : megalo baş,mavi ok ; globozoa baş, siyah ok;uzun baş))(Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir,40X)

Resim 19: İMSİ işlemi ile seçilmiş spermde boyun dropleti)(Fotoğraf Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar'ında çekilmiştir,a 20X, b.40X)

3.4 Folikül aspirasyonu, denudasyon ve İCSİ (İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) işlemi

Oosit aspirasyonundan sonra foliküllerden elde edilen kümülüs oosit kompleksleri “*human tubal fluid*” (HTF) sıvısında (Life Global®, Seattle, ABD) yıkanıp 3 saat %6 CO₂, %5 O₂ ve 37°C’ye ayarlı inkübatörde bekletildiler. Bu sürenin sonunda, denüasyon işlemi, HTF içerisine 40 IU/ ml yoğunluğunda hazırlanan hiyalüronidaz enzim (Life Global®, Seattle, ABD) solüsyonu içinde mekanik pipetleme ile gerçekleştirildi.

Bu işlem sonrasında, oositler 60 dakikalık bir inkübasyon sonrası ICSI işlemi uygulandı. Mikroenjeksiyon işlemi, x400 büyütmede Olympus IX70, Olympus IX71 inverted mikroskop altında HEPES (Life Global®, Seattle, ABD) içeren HTF mediumu içerisinde yapıldı.



Resim 20: Oosit inkübasyon kültür kabı, **Resim 21:** İCSI petrisi

(Fotoğraflar Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar’ında çekilmiştir)



Resim 22: İCSI İşlemi

(Fotoğraflar Bahçeci Tüp Bebek Merkezi IVF Laboratuvar’ında çekilmiştir)

Enjeksiyonu tamamlanmış oositler minimum 4 saat öncesinden %6 CO₂, %5 O₂ ve 37°C'de önceden inkübe edilmiş özel kaplara (EmbryoSlide®, Unisense Fertilitech, Aarhus, Danimarka) alındılar (Resim 23).



Resim 23; Blastokist'e kadar takip edilebilen embriyoskop cihazı ve embryo slide kabının görünüşü

3.5 Embriyo Kültürü ve İnkübasyonu

EmbryoSlide™ kabının her bir kuyusu 25 µl hacminde ve %10 oranında plasmanat (Life Global®, Seattle, ABD) protein takviyesi içeren tek adımlı embriyo kültür sıvısıyla (Life Global®, Seattle, ABD) dolduruldu ve 12 kuyucuğun üzeri 1.5 ml parafin yağı ile (LifeGlobal®, Seattle, ABD) örtüldü. ICSI sonrasında, enjekte edilmiş oositler her kuyunun içerisindeki kuyucuğa bırakılıp Sürekli embriyo takip sistemine yüklendi (EmbryoScope™, Unisense Fertilitech, Aarhus, Danimarka)(Resim 23).EmbryoScope® inkübatörünün ortamı %6 CO₂, %5 O₂ ve 37°C'de embriyolar transfere kadar beş gün kültürde bırakıldılar.Embriyoskop cihazında her 20 dakika'da alınan görüntüler ile; pronukleus oluşum zamanları , döllenen sonra çekirdeklerin silinmesi,ilk ve sonraki klivajların kesin

zamanının belirlenmesi, ilk bölünmeden sonra çekirdeklerin görülmesi, hücre bölünmelerinin senkron ve asenkron olarak takibi, embriyo fragmantasyon geçmişi, blastosöl boşluğunun oluşum zamanı belirlendi. Aşağıda belirtilen semboller ile kültürde embriyo zamanlaması not edildi;

t2: İki hücreye bölünme zamanı

t2: İki hücreye bölünme zamanı

t3: Üç hücreye bölünme zamanı

t4: Dört hücreye bölünme zamanı

t5: Beş hücreye bölünme zamanı

t6: Altı hücreye bölünme zamanı

t7: Yedi hücreye bölünme zamanı

t8: Sekiz hücreye bölünme zamanı

t9+: Dokuz hücreye ulaşma zamanı

tM: Morula evresine ulaşma zamanı

tSB: Blastülasyonun başlangıcı

tB: Blastosist evresine ulaşma zamanı

3.6 Kullanılan malzemeler:

1	Falcon grubu tamamı pipetler tüpler	B.D.Bionsciences	USA
2	Single step medium	IrvineScientific	USA
3	SSS	IrvineScientific	USA
4	Nunc (150270-4wel)	ThermoScientific	DENİMARKA
5	Hamilton enjektör	Hamilton Company	USA
6	Embryoscope ve emb sılaydı	UnisenseFertilitech A/S	DENİMARKA
7	Eppendorflar	EppendorfGmbh	ALMANYA
8	Laminar flow	LaboGene APS	DENİMARKA
9	Laminar flow içindeki mikroskop	Carl ZeissGmbh	ALMANYA
10	Mikromaniplator	NarishigeScientificInt.Lab.	JAPONYA
11	ICSI iğnesi	Sunlight	USA
12	incubabator marka model vs o2	IKSInternational	HOLLANDA

	kontrollu		
13	Santrifuge	LaboGene APS	DENİMARKA
14	opu toplama seti	SarstedGmbh	ALMANYA
15	pastör pipetler	HeinzHerenzMedi.Gmbh	ALMANYA
16	sperm washırvine	IrvineScientific	USA
17	pure sperm nidakon	NidaconInernational	İSVEÇ
18	200 likpipetör	EppendorfGmbh	ALMANYA
19	10 mikrolitrelikpipetör	EppendorfGmbh	ALMANYA
20	Streril sperm toplama kabı	Fırat Med	TURKİYE
21	Opu toplarken kullanılan pipet puarı.	IsolabLab. Gmbh	ALMANYA
22	Mini inkubatorlaboteclaminar	LabotectLab.Tec. Gmbh	ALMANYA
23	Makler kamerası	SefiMedical	İSRAİL
24	sperm sayımında kullanılan mikroskop	Carl ZeissGmbh	ALMANYA
25	hyalürinidase	Irvine Scientific	USA
26	Pvp	IrvineScientific	USA
27	Oil	IrvineScientific	USA
28	150 likdenudasyon(ayıklama pipeti)	GyneticsMed. Produc	BELÇİKA
29	M HTF IRVINE	IrvineScientific	USA
30	transfer kateterleri	Smith Medical	MEXICO
31	steril eldiven	Beybi Plastik	TURKİYE

4.BULGULAR

Bu çalışmada Mesa ve Tese olgularında fertilize oosit sayısı ejakulat spermi ile kıyaslandığında daha düşük sayıda ve ejakulat spermi olgularında daha yüksek fertilizasyon oranı görülmüştür (Tablo 6,p=0.005, p= 0.041)

Tablo 6: Sperm kaynağı gruplarında yaş ve oosit bilgileri.

	TESE	MESA	NORMOSPERMİ	Kruskal-Wallis Test	
	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)		
Yaş (Kadın)	32,10 \pm 5,26 (20)	33,67 \pm 5,26 (18)	31,05 \pm 4,36 (20)	1,99	p= 0,369
Yaş (Erkek)	36,55 \pm 6,38 (20)	38,06 \pm 5,02 (18)	33,05 \pm 4,86 (20)	5,42	p= 0,061

Toplam oosit	12,05 ± 3,63 (20)	11,11 ± 6,53 (18)	11,85 ± 2,64 (20)	2,8	p= 0,247
m2	10,20 ± 3,00 (20)	9,44 ± 6,14 (18)	10,25 ± 2,45 (20)	2,53	p= 0,282
m2 (%) *	% 86 ± %12 (20)	% 84 ± % 12 (18)	%87 ± %11(20)	0,44	p= 0,803
m1	0,65 ± 0,81 (20)	0,89 ± 0,6 (18)	0,65 ± 0,99 (20)	1,04	p= 0,594
m1 (%) **	% 5 ± % 5 (20)	% 8 ± % 9 (18)	% 5 ± %7 (20)	1,32	p= 0,515
gv	1,10 ± 1,33 (20)	0,61 ± 0,61 (18)	0,5 ± 1,19 (20)	0,64	p= 0,727
gv (%) ***	% 8 ± % 9 (20)	% 6 ± % 6 (18)	% 8 ± % 9 (20)	0,16	p= 0,922
Fertilize oosit	7,35 ± 2,30 (20)	5,89 ± 2,00 (18)	8,55 ± 2,21 (20) #	10,72	p= 0,005
Fertilizasyon (%) ****	% 75 ± % 19 (20)	% 72 ± % 20 (18)	% 85 ± % 14 (20) #	6,43	p= 0,041

: İstatistiksel olarak anlamlı fark görülen grup.

* : m2 / toplam oosit

** : m1 / toplam oosit

*** : gv / toplam oosit

**** : Normal fertilizasyon (%) : Normal fertilizasyon / m2

Çalışmaya dahil olan olgularda 1 ve 2 embriyo transferinin gruplar arasındaki dağılımı Tablo 7 de gösterilmiştir.

Tablo 7: 1 ve 2 embriyo transferinin gruplar arasında dağılımı

Transfer edilen embriyo sayısı	TESE (n=20)	MESA (n=18)	NORMOSP. (n=20)
1	% 25	% 50	% 55
2	% 75	% 50	% 45

Ki-Kare= 4,18 ; p= 0,124

Ejekulat spermi grubunda 5 ve 6 günlük embriyoların oranının, TESE ve MESA grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür.(p=0.018) (Tablo 8)

Tablo 8:Embriyo transfer gününün farklı sperm kaynağı gruplarında dağılımı

Embriyonun transfer edildiği gün	TESE (n=20)	MESA (n=18)	NORMOSPER (n=20)
3. ve 4. Gün	% 65	% 72,2	% 30
5. ve 6. Gün	% 35	% 27,8	% 70

Ki-Kare= 8,02 ; p= 0,018

Tablo 9: Ejekülat spermi, tese ve mesa gruplarında transfer edilen 1. embriyonun durumu.

Transfer edilen 1. embriyo	TESE (n=20)	MESA (n=18)	NORMOSP. (n=20)
Morula öncesi	% 45	% 61	% 25
Morula	% 25	% 17	% 20
Blastokist	% 30	% 22	% 55

Ki-kare = 12,74 ; p= 0,002 (Kruskal wallis test)

Tablo 10: Ejekülat spermi, tese ve mesa gruplarında transfer edilen 2. embriyonun durumu

Transfer edilen 2. embriyo	TESE (15)	MESA (9)	NORMOSP. (9)
Morula öncesi	% 67	% 33	% 11
Morula	% 27	% 44	% 56
Blastokist	% 7	% 22	% 33

Ki-kare = 7,46 ; p= 0,024 (Kruskal Wallis Test)

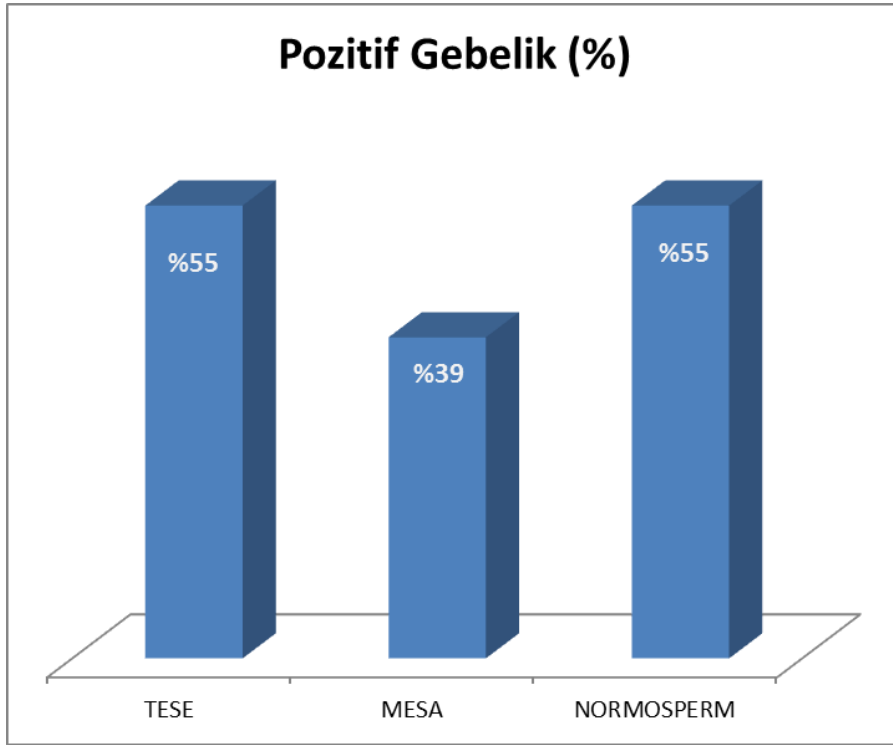
Tese ve normospermik grupta benzer gebelik oranları bulunmuşken (%55), Mesa grubunda gebelik oranı düşük bulunmuştur (%39) ancak olgu sayısının az olması nedeni ile istatistiki anlamlılığı bulunamamıştır (Tablo 11, grafik 1).

Tablo 11: Gruplarda pozitif ve negatif gebelik oranları

Gebelik	TESE (n=20)	MESA (n=18)	NORMOSPERM (n=20)
Pozitif	% 55	% 39	% 55
Negatif	% 45	% 61	% 45

Ki-Kare = 1,29 ; p= 0,525

Grafik 1 :Tese, mesa ve ejekülat spermi gruplarında pozitif gebelik oranları.



Tablo 12 : tese ,mesa ve normospermi gruplarında embriyo gelişim zamanları.

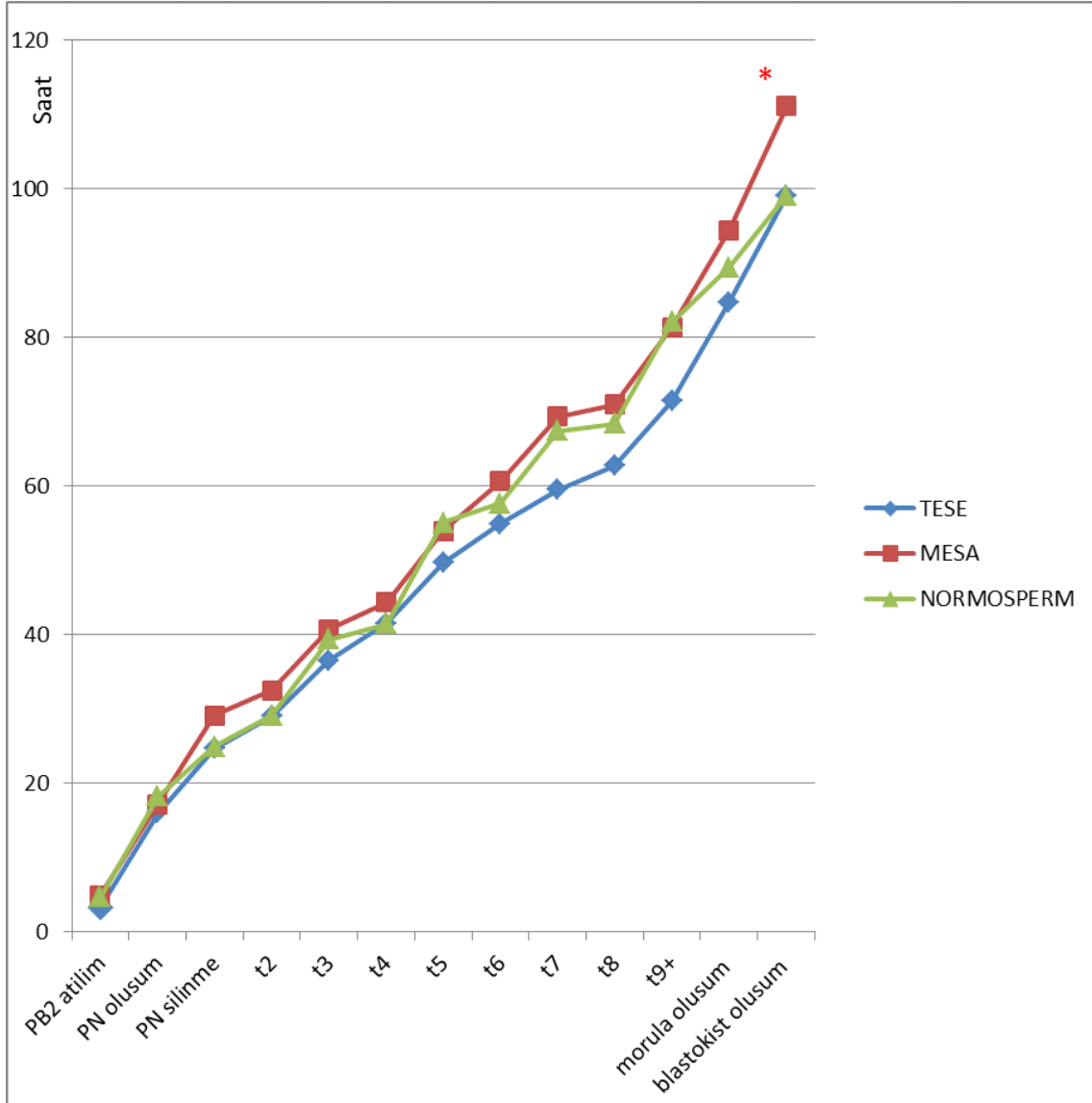
Embriyo oluşum aşamaları (Saat)	TESE	MESA	NORMOSPERMİ.	Grupların karşılaştırılması	
	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)		
PB2 atılım	3,29 ± 1,61 (151) #	4,91 ± 5,17 (109)	4,64 ± 1,59 (171)	F=12,28	p=0,0005
PN olusum	15,95 ± 2,18 (155) #	17,15 ± 4,67 (114) #	18,16 ± 1,61 (177) #	F=24,63	p=0,0005
PN silinme	24,68 ± 5,30 (150)	29,07 ± 7,50 (105) #	24,90 ± 3,36 (167)	F=25,44	p=0,0005
t2	29,04 ± 5,94 (148)	32,46 ± 7,06 (107) #	29,06 ± 4,81 (171)	F=13,67	p=0,0005
t3	36,53 ± 7,03 (146) #	40,69 ± 7,55 (105)	39,36 ± 5,90 (171)	F=13,00	p=0,0005
t4	41,49 ± 9,13 (144)	44,33 ± 9,45 (102) #	41,45 ± 7,00 (171)	F=4,48	p=0,0118
t5	49,66 ± 11,53 (134) #	53,89 ± 10,25 (92)	55,02 ± 9,72 (163)	F=10,13	p=0,0005
t6	54,86 ± 12,05 (125)	60,63 ± 12,99 (82) #	57,60 ± 10,02 (163)	F=6,40	p=0,0018
t7	59,46 ± 11,50 (94) #	69,35 ± 17,96 (68)	67,42 ± 12,68 (139)	F=13,15	p=0,0005
t8	62,73 ± 11,92 (74) #	70,90 ± 16,57 (47)	68,31 ± 12,06 (136)	F=6,83	p=0,0012
t9+	71,40 ± 15,25 (45) #	81,30 ± 18,93 (24)	82,05 ± 10,17 (32)	K-W=12,99	p=0,0015

Morula zamani	olusum	84,71 ± 14,06 (45)	94,38 ± 15,25 (27)	89,41 ± 12,28 (85)	K-W=4,76	p=0,0924
Blastokist zamani	olusum	99,10 ± 9,89 (26)	111,05 ± 12,43 (20) #	99,07 ± 8,90 (62)	K-W=13,88	p=0,0009

: İstatistiksel olarak anlamlı fark görülen grup.

F: ANOVA-one way

K-W: Kruskal-Wallis Test



Grafik 2: Tese, mesa ve ejakulat spermi gruplarında embriyo gelişim zamanları.

*: Diğer iki gruptan anlamlı farklılık gösteren TESE grubu değerleri.

*: Diğer iki gruptan anlamlı farklılık gösteren MESA grubu değerleri.

*: Diğer iki gruptan anlamlı farklılık gösteren NORMOSPERM grubu değerleri.

TESE grubunda icsi yapıldığı andan itibaren diğer gruplara göre daha kısa zamanda tamamlanan süreçler: PB2 atılım, PN oluşum, t3, t5, t7, t8, t9+ olarak saptanmıştır(Tablo 12, Grafik 2).

MESA grubunda icsi yapıldığı andan itibaren diğer gruplara göre daha uzun zamanda tamamlanan süreçler: PN kaybolma, t2, t4, t6, blastokist oluşumu olarak saptanmıştır (Tablo 12, Grafik 2)

Normospermi grubunda icsi yapıldığı andan itibaren diğer gruplara göre daha uzun zamanda tamamlanan süreç PN oluşumudur. PB2 atılımdan PN oluşuma geçiş en uzun süreyine normospermi grubunda görülmüştür. ($p=0.0005$) (Tablo 12,Grafik2)

PN oluşumundan sonra PN'in en hızlı kaybolduğu grup normospermi grubunda (6,77 saat), en uzun kaybolma süresi ise MESA (11,81 saat) grubunda bulunmuştur.($p=0.0001$) (Tablo 12, Grafik 2).

PB2 atılımından sonra PN'in kaybolmasına kadar geçen en uzun süre MESA grubunda görülmektedir.($p=0.0001$)(Tablo 12, Grafik 2).

PN kaybolduktan sonra morula oluşumuna kadar geçen süre üç grupta da farklılık göstermemektedir ($p= 0,5190$)(Tablo 12, Grafik 2).

Morula oluştuktan sonra blastokist oluşumuna kadar geçen süre MESA grubunda daha uzun olduğu görülmektedir ($p= 0.0009$) (Tablo 12).

Gruplar arasında PN oluşumundan PN silinmesine ve 2 hücreli embriyoya geçişte istatistiki anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 13), TESE olgularında t4'den t8'e

geçiş süresinin diğer gruplara göre anlamlı olarak daha kısa sürede olduğu bulunmuştur (Tablo 13).

Tablo 13 : TESE ,MESA ve Kontrol gruplarında embriyo gelişim ara fazları zamanlaması

Süreler (Saat)	TESE	MESA	NORMOSPERM	Grupların karşılaştırılması	
	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)		
PB2 atılımdan PN oluşuma geçiş	12,72 ± 2,48 (147)	12,31 ± 2,93 (105)	13,49 ± 2,22 (171) #	F=08,05	p=0,0005
PN oluşumdan PN silinmeye geçiş	9,15 ± 5,06 (139) #	11,81 ± 6,23 (104) #	6,77 ± 3,54 (167) #	F=34,81	p=0,0001
PB2 atılımdan PN silinmeye geçiş	21,42 ± 5,44 (149)	24,09 ± 5,62 (105) #	20,28 ± 3,44 (167)	F=20,54	p=0,0001
PN silinmeden morulaya geçiş	61,74 ± 12,55 (45)	67,27 ± 15,12 (27)	65,18 ± 11,61 (82)	K-W= 1,31	p=0,5190
Moruladan blastokiste geçiş	14,56 ± 8,44 (26)	16,44 ± 14,42 (16)	12,66 ± 7,5 (62)	K-W= 0,81	p=0,6688
PN oluşumdan t2'ye geçiş	12,74 ± 5,43 (144) #	15,66 ± 7,25 (107) #	10,92 ± 4,92 (171) #	F=22,21	p=0,0001
PN silinmeden t2'ye geçiş	4,51 ± 3,89 (148)	3,95 ± 2,81 (104)	4,12 ± 2,80 (167)	F=1,03	p=0,3561
t2'den t3'e geçiş	7,81 ± 6,53 (146)	8,28 ± 5,61 (105)	10,30 ± 4,65 (171) #	F=8,75	p=0,0005
t2'den t4'e geçiş	12,72 ± 6,99 (144)	12,07 ± 7,92 (102)	12,39 ± 5,99 (171)	F=0,27	p=0,7613
t3'ten t4'e geçiş	5,29 ± 7,04 (144)	3,88 ± 6,37 (102)	2,09 ± 4,91 (171) #	F=11,03	p=0,0005
t3'ten t5'e geçiş	13,81 ± 8,27 (134)	13,94 ± 8,37 (92)	16,28 ± 8,29 (163) #	F=4,02	p=0,0187
T4'ten t8'e geçiş	24,61 ± 8,87 (74) #	29,76 ± 15,11 (47)	28,44 ± 11,06 (136)	F=3,79	p=0,0241
t5'ten t8'e geçiş	16,24 ± 8,77 (74)	19,66 ± 14,89 (47) N	14,93 ± 9,86 (136)	F=3,44	p=0,0337
T8'den morulaya geçiş	22,03 ± 12,33 (34)	19,16 ± 12,69 (16)	24,19 ± 12,80 (76)	K-W= 2,84	p=0,2415

: Diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren grup.

N : Yalnız normosperm grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren grup.

F: ANOVA-one way

K-W: Kruskal-Wallis Test

Tablo 14. Gruplarda t8, morula ve blastokiste ulaşma oranları..

	TESE	MESA	NORMOSPERM	Ki-Kare	p
	%	%	%		
t8 (%)	47,7	41,2	76,8#	45,5	0,0005
Morula (%)	29,0	23,7	48,0#	21,9	0,0005
Blastokist (%)	16,8	17,5	35,0#	18,7	0,0005

: Diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren grup.

t8(%): t8 sayısı / PN oluşum sayısı

Morula (%): Morula sayısı / PN oluşum sayısı

Blastokist (%): Blastokist sayısı / PN oluşum sayısı

Grupların karşılaştırılmasında Pearson Chi-Square Test uygulanmıştır.

Tüm gruptaki olgular gebelik pozitif ya da negatif olarak tasnif edildiklerinde; Pozitif gebelik grubunda fertilizasyon süresinin daha uzun olduğu (p=0.047, tablo 10), blastokist aşamasındaki embriyoların oranı daha fazla olduğu görülmüştür (p=0.027, tablo 12). Pozitif gebelik grubunda diğer gruplara göre icisi yapıldığı andan itibaren daha uzun zamanda tamamlanan süreçler t5, t6, t7'dir. (p=0.005, p= 0.029, p=0.039, Tablo 15, grafik 3). T3'den t5 'e geçiş süresi (2. Hücre siklusu) ve t8'den morulaya geçiş süresi gebe olan ve olmayan olgular kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olarak kısa bulunmuştur (p=0.014, p=0.038) (Tablo 17).

*

Tablo 15: pozitif ve negatif gebelik gruplarında yaş ve oosit bilgileri.

	Pozitif gebelik	Negatif gebelik	Mann-Whitney U Test	
	$\mu \pm \sigma$	$\mu \pm \sigma$		
Yaş (Kadın)	31,45 ± 5,18 (29)	33,00 ± 4,75 (29)	Z= 0,85	p= 0,395
Yaş (Erkek)	34,90 ± 5,41 (29)	36,72 ± 6,09 (29)	Z= 1,01	p= 0,315
Toplam oosit	11,45 ± 3,52 (29)	11,93 ± 5,24 (29)	Z=0,16	p= 0,876
m2	9,75 ± 3,13 (29)	10,17 ± 4,84 (29)	Z=0,29	p= 0,772
m2 (%) *	0,86 ± 0,12 (29)	0,85 ± 0,11 (29)	Z=0,55	p= 0,578
m1	0,52 ± 0,78 (29)	0,93 ± 0,99 (29)	Z=1,67	p= 0,095
m1 (%) **	0,04 ± 0,05 (29)	0,07 ± 0,09 (29)	Z= 1,67	p= 0,095
Gv	1,03 ± 1,23 (29)	0,76 ± 0,95 (29)	Z=0,66	p= 0,509
gv (%) ***	0,08 ± 0,09 (29)	0,07 ± 0,08 (29)	Z=0,69	p= 0,485
Normal fertilizasyon	7,86 ± 2,41 (29) #	6,76 ± 2,29 (29)	Z= 1,99	p= 0,047
Normal fertilizasyon (%) ****	0,82 ± 0,14 (29)	0,72 ± 0,22 (29)	Z= 1,55	p= 0,121

: İstatistiksel olarak anlamlı fark görülen grup.

* : m2 / toplam oosit

** : m1 / toplam oosit

*** : gv / toplam oosit

**** : Normal fertilizasyon (%) : Normal fertilizasyon / m2

Tablo 16:Gruplarda gebelik pozitif ve negatif olguların transfer edilen embriyo sayısının yüzde dağılımı

Transfer edilen embriyo sayısı	Gebelik	
	Pozitif (n=29)	Negatif (n=29)
1	44,8%	41,4%
2	55,2%	58,6%

Ki-Kare = 0,07 ; p= 0,791

Tablo 17:Gebelik negatif veya pozitif olgularda transfer gününün yüzde dağılımı

Embriyonun transfer edildiği gün	Gebelik	
	Pozitif (n=29)	Negatif (n=29)
3. ve 4. Gün	41,4%	69,0%
5. ve 6. Gün	58,6%	31,0%

Ki-Kare = 4,46 ; p= 0,035

Tablo18:Gebelik pozitif ve negatif olgularda transfer edilen 1. Embriyonun gelişim basamağı

Transfer edilen 1. embriyo	Gebelik	
	Pozitif (n=29)	Negatif (n=29)
Morula öncesi	37,9%	48,3%
Morula	10,3%	31,0%
Blastokist	51,7%	20,7%

Ki-Kare = 7,21 ; p= 0,027

Tablo 19:Gebelik pozitif ve negatif olgularda transfer edilen embriyonun gelişim aşamasının yüzdesi

Transfer edilen 2. embriyo	Gebelik	
	Pozitif (n=16)	Negatif (n=17)
Morula öncesi	37,5%	47,1%
Morula	37,5%	41,2%
Blastokist	25,0%	11,8%

K-S-Z= 0,38 ; p= 0,990 (Kolmogorov Smirnov Test)

Tablo 20: Pozitif veya negatif gebelik gruplarında embriyo gelişim zamanları.

Embriyo oluşum aşamaları (Saat)	Pozitif gebelik	Negatif gebelik	Grupların karşılaştırılması	
	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)		
PB2 atılım	3,96 \pm 1,93 (44)	3,70 \pm 1,31 (42)	t=0,73	p=0,462
PN oluşum	17,05 \pm 2,06 (46)	16,98 \pm 1,82 (44)	t=0,15	p=0,877
PN silinme	24,66 \pm 3,83 (43)	24,35 \pm 4,08 (42)	t=0,36	p=0,714
t2	29,07 \pm 5,12 (44)	28,10 \pm 4,98 (44)	t=0,89	p=0,372
t3	38,64 \pm 3,88 (44)	37,94 \pm 6,29 (44)	t=0,63	p=0,529
t4	41,27 \pm 6,21 (43)	39,77 \pm 5,34 (43)	t=1,20	p=0,231
t5	53,54 \pm 6,69 (42) #	49,02 \pm 7,48 (39)	t=2,86	p=0,005
t6	56,13 \pm 8,19 (41) #	52,22 \pm 7,48 (39)	t=2,22	p=0,029
t7	63,98 \pm 11,82 (35) #	58,70 \pm 8,47 (33)	t=2,10	p=0,039
t8	64,70 \pm 8,69 (29)	62,20 \pm 9,27 (29)	z=1,42	p=0,155
t9+	72,34 \pm 9,86 (16)	72,50 \pm 12,49 (15)	z=0,12	p=0,906
Morula oluşum zamanı	87,98 \pm 11,18 (23)	81,88 \pm 13,22 (19)	z=0,95	p=0,343
Blastokist oluşum zamanı	98,48 \pm 6,95 (21)	99,48 \pm 8,35 (10)	z=0,38	p=0,704

: İstatistiksel olarak anlamlı fark görülen grup.

t: t Test (Independent Samples Test)

z: Mann-Whitney U Test

Grafik 3: gebelik pozitif ve negatif olgularda embriyo gelişim zamanları.

* : Diğer gruptan anlamlı farklılık gösteren Pozitif gebelik grubu değerleri.

Tablo 21: Tüm gruplarda Gebe olan ve olmayan hastalarda embriyo gelişim zamanları.

Süreler (Saat)	Pozitif gebelik	Negatif gebelik	Grupların karşılaştırılması	
	$\mu \pm \sigma$ (n)	$\mu \pm \sigma$ (n)		
PB2 atılımdan PN oluşuma geçiş	13,06 ± 2,77 (44)	13,38 ± 2,08 (41)	t=0,61	p= 0,5431
PN oluşumdan PN silinmeye geçiş	7,70 ± 4,11 (43)	7,46 ± 3,86 (40)	t=0,28	p= 0,7821
PB2 atılımdan PN silinmeye geçiş	20,69 ± 4,12 (43)	20,65 ± 4,41 (42)	t=0,05	p= 0,632
PN silinmeden morulaya geçiş	63,4 ± 10,34 (22)	58,47 ± 11,92 (19)	Z=0,84	p= 0,4027
Moruladan blastokiste geçiş	12,09 ± 4,88 (21) #	18,4 ± 8,88 (10)	Z=2,07	p= 0,0384
PN oluşumdan t2'ye geçiş	12,05 ± 5,17 (44)	10,64 ± 3,98 (43)	t= 1,42	p= 0,158
PN silinmeden t2'ye geçiş	4,44 ± 3,67 (43)	3,85 ± 3,44 (42)	t=0,76	p= 0,449
t2'den t3'e geçiş	9,57 ± 4,39 (44)	9,83 ± 4,50 (44)	t= 0,28	p= 0,7821
t2'den t4'e geçiş	12,36 ± 4,73 (43)	11,78 ± 3,92 (43)	t=0,62	p= 0,5401
t3'ten t4'e geçiş	2,65 ± 5,15 (43)	1,99 ± 4,26 (43)	t=0,64	p= 0,5232
t3'ten t5'e geçiş	14,97 ± 4,48 (42) #	12,15 ± 4,41 (39)	t=2,85	p= 0,0056
T4'ten t8'e geçiş	25,28 ± 8,96 (29)	23,19 ± 7,35 (29)	Z=1,27	p=0,2050
t5'ten t8'e geçiş	12,24 ± 8,64 (29)	12,84 ± 9,95 (29)	Z=0,10	p= 0,9192
T8'den morulaya geçiş	15,52 ± 9,13 (10)	22,35 ± 10,86 (16)	Z=1,42	p= 0,1550

: İstatistiksel olarak anlamlı fark görülen grup.

t: t Test (Independent Samples Test)

Z: Mann-Whitney U Test

5.TARTIŞMA

Sürekli embriyo izleme sistemleri (*time lapse monitoring*) 2011 yılından itibaren IVF kliniklerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmış , embriyo gelişiminde önemli parametreler araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.Embriyo gelişiminde fertilizasyonu takiben pronukleus oluşumu, silinmesi ,singami, 1.,2.,3. Hücre siklusları , optimal bölünme zamanları , morula ve blastokiste gidiş zamanlamaları pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir.2011 yılında yapılan bir çalışmada ; embriyoskopta izlemeye alınmış 247 embriyonun ,iki hücreden üç hücreye ,üç hücreden dört hücreye ve dört hücreden beş hücreye geçiş zamanları değerlendirmeye alınmış ve implantasyonu öngörme modeli oluşturulmuş, buna bağlı olarak embriyo bölünme zamanları en önemli şekilde kullanılabilen üç parametre olarak değerlendirilmiştir(40). Embriyo kültür koşullarının insan embriyosu morfokinetik verilerine etkileri konusunda yapılan çalışmalar, tek fazlı ve ardışık kültür solüsyonlarının embriyo gelişim zamanlamasında anlamlı farklılıklar ortaya çıkarmadığını göstermiştir(11).Basile ve ark.2012,(7). Yine hastalara uygulanan stimülasyon protokollerinin embriyo gelişiminde farklı etki yaratmadığı tarafından gösterilmiştir(42). Bu çalışmada kontrollü over stimülasyonunda kullanılan GnRH analogu ,yumurta tetikleyici faktör,GnRH agonisti ve GnRH antogonisti kullanılarak elde edilmiş yumurtalara icisi işlemi yapılmış ve embriyoskopta izlemeye alınmış, embriyoların ilk bölünmelerinde farklılık görülmüş olsada morfokinetik özelliklerinde ve embriyo kalitesinde bir fark bulunmadığı gösterilmiştir(42).

2013 yılında yapılan bir çalışmada , sürekli embriyo izleme ve görüntüleme sistemiyle izlenen sigara içen kadınların embriyoları ile sigara içmeyen kadınların embriyoları aralarında anlamlı bir gelişim farkı gözlenmiş; sigara içen kadınların embriyoları içmeyenlere göre daha yavaş geliştiği belirlenmiştir (25).Yine başka bir çalışmada % 5 oksijenli embriyoskop ile % 20 oksijenli embriyoskop arasında,embriyo morfokinetiği incelenmiş,embriyoların 3.klivaj'a ve erken blastokiste % 20 oksijenli embriyoskopta % 5 oksijenli embriyoskopa göre daha uzun zamanda ulaştığı gösterilmiştir (34).

Günümüze kadar , sadece erken kinetik, blastula ve implantasyon potansiyeli arasındaki ilişki konusunda birkaç çalışma yapılmıştır(5).2012 de ICSI uygulamasından pronukleus silinmesine kadar olan sürenin implantasyon ile ilişkisini göstermiş, yine 2012 de Rubio ve arkadaşları, Dal Canto ve arkadaşları, Hlinka ve arkadaşları embriyo gelişiminde 1.,2.ve 3. Hücre sikluslarının zamanlamasının implantasyon ile ilişkisini göstermişlerdir(49,19,30).2012 de yapılmış embriyoskop ta morfokinetik yapıları izlenen embriyolarda 2 hücreden 8 hücreye gelişim zamanlarının blastosist oluşturma , blastosöl boşluğu oluşum zamanı ve implantasyon olasılığının daha yüksek olan embriyolarda daha

kısa olduğu görülmüş (19,27,17)embriyo gelişim özelliklerinin blastokist kalitesi ile ilişkisini sürekli embriyo izleme sistemlerinde göstermişlerdir.Diğer bir çalışmada ise ; embriyoskopta izlenen 247 embriyonun 3. Gününde transferleri yapılmış ve implantasyon ile ; embriyonun, 2 hücreden 3 hücreye ,3 hücreden 5 hücreye bölünme zamanları arasında bir ilişki bulunmuş (38).Bu çalışmaya benzer bir çalışmada da blastokist oluşturma kapasitesi ve blastokist kalitesi ile 2 hücreden 3 hücreye , 3 hücreden de 5 hücreye geçiş zamanları arasında anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür(17).Wong ve arkadaşları araştırma için bağışlanan çözülmüş pronükleer zigotları kullanarak, İlk sitokinez (P1) süresine göre blastokiste ulaşması muhtemel embriyoları seçmek için bir algoritma geliştirdi,bu algoritma birinci ve ikinci mitoz (P2) ile , ikinci ve üçüncü mitoz arasındaki zaman (P3, s2 diye adlandırılan) arasındaki senkronizasyonu içermekteydi. Conaghan ark., Bir bilgisayar otomatik *time-lapse* sistemini kullanarak, geleneksel gün 3 morfoloji sınıflandırması ile iki kinetik uç noktaları P2 ve P3 kombinasyonu kullanarak blastokist haline gelme olasılığı en yüksek embriyoları seçmeyi denedi(12). Kirkegaard ve arkadaşları ilk sitokinez süresini bildirdi, 3 hücreye 3 hücreli aşamasında ve doğrudan bölünme süresi blastosist oluşumunu öngörmeye yararlı parametreler olduğunu gösterdi(33). Meseguer ve arkadaşları 5 hücreye ulaşma zamanı (t5) ve 2. hücre döngüsü zamanının(cc2) embriyo canlılığını gösterdiğini ileri süren çalışmalar yaptılar(39).Bizim çalışmamızda gebelik pozitif ve negatif olgular dikkate alındığında , 5-6-7 hücreye geçiş süresi (t5,t6,t7) istatistiki olarak anlamlı farklı bulundu(Tablo 15,Grafik 3), (p=0.014).Ayrıca bu konuda çalışan araştırmacıların tespit etmediği ,morula aşamasından blastokiste gidiş süresinin de istatistiki olarak anlamlı farklılık gösterdiği anlaşılmıştır (Tablo 16 ,p=0.034). Herrero ve ark, 3 ya da 5 günlük embriyo transferi olgularında embriyo gelişim kinetiğinde kullanılan bir model sundu (28).Yaptıkları kapsamlı analiz sonucunda t5 ve t8 t2, t3, kısa vadede tek belirteç olduğu gösterildi, t4 gibi erken kinetik parametreler iseblastosist aşamasına canlılığın devamı göstergesi olduğu anlaşılmıştır.Başka bir çalışmada ise PGD ile tespit edilmiş olan normal ve anormal embriyoların kinetiğinin farklı olduğu ve oluşturulan algoritma ile PGD uygulamadan kromozomal açıdan normal embriyoların seçiminin yapılabileceği olasılığı gündeme getirilmiştir(8).Alison ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise düşük risk taşıyan embriyoların transferi ile canlı doğum oranı %65 civarında artmıştır(10).

Bu çalışmada sperm kaynağı farklı olan, Tese ve Mesa olgularında embriyo morfokinetiğinin farklılık gösterdiği ortaya çıkmıştır. Sperm kaynağına göre embriyoskop verileri ejakulat sperminin kullanıldığı olgularla karşılaştırılmış, Tese ve mesa olgularında

kutup cisimciği(polar body) atılımı, pronukleus oluşumu , PN silinmesi,t2,t3,t4,t5,t6,t7,t8,t9+ ve Blastokist aşamasına gelinceye kadar istatistiksel anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 12, Grafik 2). Tese olgularının kutup cismi atılımı, PN oluşumu, t3,t5,t7,t8,t9+ embriyo gelişim aşamalarına daha kısa sürede ulaştığı, Mesa olgularının PN oluşum süresinin kısa ancak PN silinme, t2,t4,t6 ve Blastokiste gidiş sürelerinin daha uzun olduğu anlaşılmıştır (Tablo 12,Grafik 2).Elde edilen bu bulgular TESE ve MESA embriyolarının takibinde ejakulat spermi ile ICSI yapılmış oositlerden elde edilen embriyoların mitoz döngülerinde farklılıklar olduğunu göstermiştir.Kontrol grubu olarak ele aldığımız ejakulat spermi olgularının embriyo gelişimi zamanlaması Desai ve arkadaşlarının 2014'de yaptıkları çalışmada verdikleri zamanlama detayları ve implante olan embriyo sonuçlarımızla uyum göstermektedir (20). Araştırmacıların implante olmayan embriyo detayları ise bizim elde ettiklerimizden farklı bulunmuştur. Bu farklılığın muhtemelen kullanılmış olan tese ve mesa spermlerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda tüm olgulardaki gebelikler ele alındığında , blastokist transferlerinde 3. güne kıyasla gebelik oranlarının yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 13, p=0.027).Gardner ve ark. (1997) bu konuda yaptıkları ilk çalışmalarda blastokist transferinin 2. Veya 3. Gün embriyo transferine oranla daha yüksek gebelik ile sonuçlandığını göstermişlerdir(26). Çalışmamızda ejakulat spermlerinde blastokiste gidiş % 70 iken , mesa'da % 27.8, tese'de ise %35 bulunmuştur. Bu oranların istatistiki olarak anlamlılığı gösterilmiştir (tablo8,p=0.018). Testis sperminin ejakulat spermine göre daha düşük fertilizasyon oranı ve daha düşük kalite embriyo geliştirdiği çeşitli araştırmacılarca gösterilmiştir(43,48).Bu çalışmalar bizim elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Bu çalışmada ejakulat spermi, tese veya mesa spermi olgularında gebelik oranları istatistiki olarak anlamlı bulunmamakla birlikte mesa örneklerinde daha düşük bulunmuştur (Grafik 1). Olgu sayısının artması bu olgularda anlamlı bir azalma göstereceği yönündeki düşüncemizi destekler niteliktedir. Weng ve arkadaşlarının 2014 de yaptıkları bir çalışmada mesa olgularında ejakulat spermi ICSI olgularına kıyasla istatistiki anlamlı olarak daha fazla kompleks kromozomal aneuploidi gözlenmiştir(59).Turner ve arkadaşları (1999) sıçanlarda deneysel oluşturulan vas deferens obstrüksiyonu sonrası kaput epididimal epitelde sistince zengin luminal protein sekresyonunda azalma gözlemlediler(56).Rajalakshmi ve arkadaşları (1993) obstrüktif azospermili erkeklerde kaput epididimis'te lümen daralması, dejenerasyon ve yüksek oranda ultrastrüktürel anomaliler saptadılar(46).Çalışmamızda elde edilen MESA

spermlerinin tümü obstrüktif azospermi olgularındandır.Çalışmamızda mesa olgularında singami süresi , t4 ve blastokiste ulaşma süresinin diğer gruplara oranla anlamlı bir şekilde uzun olduğu görülmüştür (Tablo 12).Obstrüktif azospermi olgularında uygulanmış olan mesa işleminde spermier gerektiğinden çok daha fazla epididimal ortamda beklemektedirler. Bu bekleme süresinin sperm DNA hasar miktarını artırma olsılığı da göz önünde tutularak, ve araştırıcıların aneplöidik sperm oranının yüksek bulma tespiti de dikkate alındığında , *obstrüktif azospermi* olgularında **mesa** uygulaması yerine **tese** uygulamasının daha yararlı olabileceğini düşünmekteyiz

KAYNAKLAR

1. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1270–83. doi: 10.1093/humrep/der037
2. RP Amann, 1993 The epididymis and sperm maturation: a perspective RP Amann, RH Hammerstedt and DN Veeramachaneni *Reproduction, Fertility and Development* 5(4) 361 - 381 Published: 1993
3. Amann RP, Howards SS Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol.* 1980 Aug;124(2):211-5.
4. Antczak, M. and Van Blerkom, J. (1999) Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum. Reprod.*, 14, 429-447
5. Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen A.L. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012; 27: 2649-2657
6. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002; 23(1):1-8
7. Natalia Basile,, Dean Morbeck , Juan Garcí'a-Velasco , Fernando Bronet , and Marcos Meseguer Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril* 2014 Mar 11;101(3):699-704. Epub 2014 Jan 11.
8. Basile, N., Morbeck, D., Garcia-Velasco, J., Bronet, F. and Meseguer, M. “Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes” *Human Reproduction*, Vol.28, No.3 pp. 634–641, 2013
9. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005;20(1):185-90.)
10. Alison Campbell, Simon Fishel, Natalie Bowman, Samantha Duffy, Mark Sedler, Simon Thornton Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model

derived from time-lapse imaging without PGS.RBM online 2013 Volume 27, Issue 2, Pages 140–146

11. Ciray HN, Aksay T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(9):891–900. doi: 10.1007/s10815-012-9818-7

12. Joe Conaghan, Alice A. Chen, Susan P. Willman, Kristen Ivani, Philip E. Chenette, Robert Boostanfar, Valerie L. Baker, G. David Adamson, Mary E. Abusief, Marina Gvakharia, Kevin E. Loewke, Shehua Shen Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial .*Fertil Steril* 2013 Volume 100, Issue 2, Pages 412–419.e5

13. Conaghan J. Time lapse imaging of human embryos. *Semin Reprod Med.* 2014 Mar;32(2):134–40. doi: 10.1055/s-0033-1363555. Epub 2014 Feb 10. Review. Conaghan J. 2014

14. Gail A. Cornwall 2009 New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update.* 2009 Mar-Apr;15(2):213–27. doi: 10.1093/humupd/dmn055. Epub 2009 Jan 8.

15. Cornwall GA, Hann SR. Transient appearance of CRES protein during spermatogenesis and caput epididymal sperm maturation. *Mol Reprod Dev* 1995;41:37–46

16. Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K.S., Martinez, M., Perez-Cano, I., Muñoz M., Meseguer M., Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28: 569–573

17. Cruz M., Garrido, N., Herrero, J., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., Meseguer, M., Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod. Biomed. Online.* 2012; 25: 371–381

18. Jean-Louis Dacheux Sandrine Castella, Jean Luc Gatti, Françoise Dacheu, Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm *Theriogenology.* 2005 Jan 15;63(2):319–41

19. Dal Canto M, Coticchio G, Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 474–480
20. Nina Desai*, Stephanie Ploskonka, Linnea R Goodman, Cynthia Austin, Jeffrey Goldberg and Tommaso Falcone Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014, 12:54 doi:10.1186/1477-7827-12-54
21. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus H, Van Steirteghem A, Silber S. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 10:1457-1460, 1995
22. El Mouatassim S., Guérin P., Ménézo Y. *Mol. Human Reprod.*, in press, 1999. Heyman Y., Ménézo Y., 1987. In “The Mammalian preimplantation embryo Regulation of growth and differentiation in vitro” B.D. Bavister ed., Plenum 175-191., 1987
- 23 Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol.* 2011 Sep-Oct; 37(5):570-83
24. Fawcett DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod.* 1970 Jun;2:Suppl 2:90-127. PMID: 5521054
25. Fréour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barrière P. “Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women” *Fert Steril* 2013 99(7): 1944-1950
26. Gardner DK1, Lane M Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update.* 1997 Jul-Aug;3(4):367-82
27. Shu Hashimoto , Nobuhiro Kato, Kazuhiro Saeki , Yoshiharu Morimoto , Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging *Fertility and Sterility* Volume 97, Issue 2, February 2012, Pages 332–337
28. Javier Herrero , and Marcos Meseguer, Selection of high potential embryo using time-lapse imaging: the era of morphokinetics *Fertility and Sterility®* Vol. 99, No. 4, March 15, 2013 0015-0282
29. Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, de los Santos MJ, Meseguer M.

A time to look back analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development

Fertil Steril. 2013 Dec;100(6):1602-9.e1-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.033. Epub 2013 Sep 29.

30. D. Hlinka , B. Kařatová , I. Uhrinová, S. Dolinská , j. Rutarová j. řezáčová, S. lazarovská, M. Dudáš Time-Lapse Cleavage Rating Predicts Human Embryo Viability Physiol. Res. 61:

31. Keber ve ark. 2014 American Society for Biochemistry and Molecular Biology,2014.Keber R, Rozman D, Horvat S Sterols in spermatogenesis and sperm maturation J Lipid Res. 2013 Jan;54(1):20-33. doi: 10.1194/jlr.R032326. Epub 2012 Oct 23.513-525, 2012

32. Jones R, Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. Oxf Rev Reprod Biol. 1989;11:285-337. Review. PMID: 2697831 [PubMed - indexed for MEDLINE

33. Kirkegaard, K., Hindkjaer, J.J., Grøndahl, M.L., Kesmodel, U.S., Ingerslev, H.J., A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. J.Assist.Reprod.Genet, 2012 ; 29: 565–572

34. Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., Ingerslev H.J., Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. Hum.Reprod, 2012 a; 27: 1277-1285

35. Kirkegaard, K., Kesmodel, U.S., Hindkjær, J.J., Ingerslev, H.J., Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. Hum.Reprod, 2013 a; doi: 10.1093/humrep/det300

36. Kruger, T. F.; Acosta, A. A.; Simmons, K. F.; Swanson, R. J.; Matta, J.F.; Veeck, L. L.;Morshidi, M. and Brugo, S.(1987). New Method of Evaluating Sperm Morphology with Predictive Value for Human in In-Vitro Fertilization. Urol., 30(3): Pp. 248.

37. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization.(PMID:3335257) Fertility and Sterility [1988, 49(1):112-117]

38. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K.M., Ramsing, N.B., Remohi, J., The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum.Reprod, 2011; 26: 2658–2671

39. Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., Requena, A., Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil.Steril*, 2012; 98: 1481–1489
40. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K.M., Ramsing, N.B The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011 Oct;26(10):2658-71. doi: 10.1093/humrep/der256. Epub 2011 Aug 9.
41. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998 Aug;13(8):2139-46. PMID: 9756285
42. Muñoz, M., Cruz, M., Humaidan, P., Garrido, N., Pérez-Cano, I., Meseguer, M., The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol*, 2013; 168: 167-72
43. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Urol*. 2002 Apr;167(4):1753-6. PMID: 11912403 [PubMed - indexed for MEDLINE]
44. Payne D, Matthews CD. Intracytoplasmic sperm injection--clinical results from the reproductive medicine unit, Adelaide. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7(2):219-27. PMID: 7480840 [PubMed - indexed for MEDLINE]
45. Pryor JP, Hendry WF. Ejaculatory duct obstruction in subfertile males: analysis of 87 patients. *Fertil Steril*. 1991 Oct;56(4):725-3
46. Rajalakshmi M, Kumar BV, Kapur MM, Pal PC. Ultrastructural changes in the efferent duct and epididymis of men with obstructive infertility. *Anat Rec*. 1993 Oct;237(2):199-207. PMID: 8238971
47. Bernard Robaire, Barry T. Hinton : *The Epididymis* Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Third Edition edited by Jimmy D. Neill, Elsevier © 2006 chapter 22, 1071-1146

48. Rossi-Ferragut LM, Iaconelli A Jr, Aoki T, Rocha CC, dos Santos DR, Pasqualotto FF, Borges E Jr. Pronuclear and morphological features as a cumulative score to select embryos in ICSI (intracytoplasmic sperm injection) cycles according to sperm origin. *J Assist Reprod Genet.* 2003 Jan;20(1):1-7.
49. Rubio IR, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012; 98: 1458–1463.2012
50. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet.* 1993 Nov 13;342(8881):1237.
51. Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menendez S, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z. Testicular sperm extraction with ICSI for non-obstructive azoospermia. *Urology*, 49:435-440, 1997.
52. Schwarzer JU, Fiedler K, v Hertwig I, Krüsmann G, Würfel W, Schleyer M, Mühlen B, Pickl U, Löchner-Ernst D. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. *Urol Int.* 2003; 70(2):119-23.
53. Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl.* 2007 Jul;9(4):483-91. Review
54. Taşdemir I, Taşdemir M, Tavukçuoğlu S Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 1998 Feb;15(2):90-2.
55. Tesarik J, Rolet F, Brami C, Sedbon E, Thorel J, Tibi C, Thebault A. Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 11:780-783, 1996.
56. T. T. Turner , J. L. Gleavy and J. M. Harris Fluid Movement in the Lumen of the Rat Epididymis: Effect of Vasectomy and Subsequent Vasovasostomy *Journal of Andrology* Volume 11, Issue 5, pages 422–428, September-October 1990
57. Turner RM .2003 Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl.* 2003 Nov-Dec;24(6):790-803. Review PMID: 14581499 [PubMed - indexed for MEDLINE

58. L.L.Veeck ,1986 Atlas of the human oocyte and early conceptus, by Lucinda L. Veeck; Williams & Wilkins, Baltimore, 1986, 331 pp)(30)
59. Weng SP, Surrey MW, Danzer HC, Hill DL, Chen PC, Wu TC. Chromosome abnormalities in embryos derived from microsurgical epididymal sperm aspiration and testicular sperm extraction.Taiwan J Obstet Gynecol. 2014 Jun;53(2):202-5. doi: 10.1016/j.tjog.2014.04.014
60. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Fifth edition World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research 2010
61. Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. Fertil Steril. 2014 Jun;101(6):1637-48.e1-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.050. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24726214
62. Wong C, Chen AA, Behr B, Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. Reprod Biomed Online. 2013 Feb;26(2):120-9. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.11.003. Epub 2012 Nov 20. Review.
63. Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., Pera, R.A.R., Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to blastocyst stage. Nat.Biotechnol, 2010; 28: 1115–1121.Wong et al. 2010
- 64.Zini A, Zhang X, San Gabriel M. Sperm nuclear histone H2B: correlation with sperm DNA denaturation and DNA stainability. Asian J Andrology 2008;10:865-7

ETİK KURUL KARARI

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİK KURULU

Sayı: BAEK 2014/2/7

03.04.2014

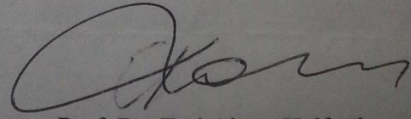
- İlgi: a) 25 Mart 2014 tarihli dilekçeniz
b) 28 Mart 2014 tarihli raportör yazısı

Sayın Ali Buran,

Erkek faktörlü infertilitede sperm kanağına göre ICSI ile elde edilen embriyoların embriyo izleme işlemi ile retrospektif olarak değerlendirilmesi konulu çalışmanız, 25.03.2014 tarihli başvurunuz kapsamında, Kurulumuzca incelenmiş olup etik açıdan onaylanmıştır.

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

NOT: İşbu belge Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurul Yönergesi temelinde kaleme alınmıştır



Prof. Dr. Ersi Abacı Kalsoğlu

Başkan

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ali	Soyadı	Buran
Doğ.Yeri	Kemalpaşa	Doğ.Tarii	07.04.1980
Uyruğu	TC	TC Kim.No	36628711554
Email	Embriyologus35@hotmail.com	Tel	05061149324

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu kurumun adı	Mez.Yılı
Lisans	Kocatepe Üniversitesi Biyoloji bölümü	2006
Lise	Cem Bakioğlu Anaolu lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sırala)

Görevi	Kurum	Yılı
Biyolog	Bahçeci Kadın Sağlığı Merkezi	2013-Halen Çalışmakta
Biyolog	Hospitalist Hastanesi	2011-2013
Biyolog	Spitaly special Ivf Center-Kosova	2010-2011

Yabancı dilleri	Anlama	Konuşma	Yazma		
İngilizce	iyi	İyi	iyi		

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
Ales Puanı(2012)	71.45	69.34	70.14

