

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



TÜP BEBEK TEDAVİSİNDE MİKRO-AKIŞKAN ÇİP (SPERM
CHIP) VE YÜZDÜRME (SWİM UP) YIKAMA
YÖNTEMLERİNİN EMBRİYO GELİŞİMİNE VE GEBELİĞE
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUSE AYYILDIZ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi GÜL İPEK GÜNDOĞAN

İSTANBUL, 2022

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**TÜP BEBEK TEDAVİSİNDE MİKRO-AKIŞKAN ÇİP (SPERM
CHIP) VE YÜZDÜRME (SWIM UP) YIKAMA
YÖNTEMLERİNİN EMBRİYO GELİŞİMİNE VE GEBELİĞE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUSE AYYILDIZ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi GÜL İPEK GÜNDOĞAN

İSTANBUL, 2022

T.C.
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ ONAY BELGESİ

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı 1711110529 numaralı yüksek lisans öğrencisi Buse AYYILDIZ'ın " Tüp Bebek Tedavisinde Mikro-Akışkan Çip (Sperm Chip) ve Yüzdürme (Swim Up) Yıkama Yöntemlerinin Embriyo Gelişimine ve Gebeliğe Etkisi" adlı tez çalışması, Enstitümüz Yönetim Kurulunun 28/02/2022 tarih ve 2022/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/03/2022

Öğretim Üyesi Unvanı - Adı ve Soyadı		İmzası
Tez Danışmanı	Dr. Öğr. Üyesi Gül İpek GÜNDOĞAN	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Abit AKTAŞ	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Hüsnüye DOĞRUMAN	

ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

.... / / 20....

Buse AYYILDIZ

İmza



ÖNSÖZ

Acıbadem Fulya Hastanesi tüp bebek bölümü kapılarını açan, tez döneminde gerekli tüm imkanları sağlayan ve bana yol gösteren hocalarım ve ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardım, destek ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanım İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Gül İpek GÜNDOĞAN'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve tüm bu süreçte beni destekleyen, bana her daim güvenen ve inanan annem Selma AYYILDIZ ve babam Sedat AYYILDIZ'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca sevgisi ile yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli eşim Efe MAZLUMOĞLU'na sonsuz sevgi ile teşekkür ederim.

İSTANBUL, 2022

Buse AYYILDIZ

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 İnfertilite	2
2.2 Oogenez	2
2.3 Oosit Toplama Prosedürü (Oosit Pick Up; Opu)	7
2.4 Morfolojik Olarak Oositlerin Değerlendirilmesi.....	7
2.5 Oositlerin Kumulus-Korona Kompleksine Göre Sınıflandırılması.....	8
2.6 Erkek Üreme Sistemi	9
2.6.1 Gonadlar	9
2.6.2 Genital kanal sistemi	11
2.6.3 Spermatogenez	12
2.6.4 Spermin yapısı	14
2.7 Erkek İnfertilitesi Ve Etiyolojisi	15
2.7.1 Erkek infertilitesi	15
2.7.2 Erkek infertilitesinin etiyolojisi	15
2.8 Embriyonik Gelişim	17
2.8.1 Normal embriyonik gelişim.....	17
2.8.2 Embriyo gelişiminin değerlendirmesi ve embriyoları sınıflandırma	20
2.8.3 Fragmantler.....	20
2.8.4 Embriyo sınıflandırma: Bölünme aşamaları.....	21
2.8.5 Blastokist transferi	24
2.9 Semen Analizi	27

2.9.1 WHO'ya göre sperm analizi terminolojileri.....	28
2.9.2 Sperm motilitesi ve hareketliliğinin değerlendirilmesi	30
2.9.3 Makroskobik değerlendirme	30
2.9.4 Mikroskobik değerlendirme	31
2.10 Sperm Hazırlama (Yıkama) Yöntemleri.....	33
2.10.1 Swim-up yöntemi	34
2.10.2 Yoğunluk yöntemi (Gradient yöntemi)	34
2.10.3 Mikro akışkan teknolojiler ve mikro akışkanlarla sperm hazırlanması ...	35
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
3.1 Çalışma Protokolü	36
3.2 Hasta Seçimi.....	36
3.3 Bakılan Parametreler	36
3.3.1. Hasta seçim kriterleri	37
3.4 Etik Kurul İzni.....	37
3.5 İstatiksel Analiz	37
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
5.1 Sonuç	48
6. KAYNAKLAR	49
EKLER.....	56
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Dünya Sağlık Örgütü'nün Belirlediği 1999 Ve 2010 Yılı Normal Semen Parametreleri	28
Tablo 2.2: Tüp Bebek Uygulamalarında Alternatif Sperm Yıkama Yöntemleri	33
Tablo 4. 1: Hastalara İlişkin Genel Özelliklerin, Embriyo Kalitelerinin Ve Gebelik Oranlarının Değerlendirilmesi.....	39
Tablo 4. 2: Gruplardaki Kadın Yaşlarının Embriyo Kalitesine Göre Değerlendirilmesi	39
Tablo 4. 3: Mikro Akışkan Çip Grubunda Kadınların Yaş Grupları İle Embriyo Kalitesi Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	40
Tablo 4. 4: Swim-Up Grubunda Kadınların Yaş Grupları İle Embriyo Kalitesi Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	40
Tablo 4. 5: Gruplardaki Kadın Yaşlarının Gebelik Durumuna Göre Değerlendirilmesi	41
Tablo 4. 6: Mikro Akışkan Çip Grubunda Kadınların Yaş Grupları İle Gebelik Oranları Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	41
Tablo 4. 7: Swim-Up Grubunda Kadınların Yaş Grupları İle Gebelik Oranları Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	41
Tablo 4. 8: Mikro Akışkan Çip Grubunda Embriyo Kalitesi İle Gebelik Oranı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	42
Tablo 4. 9: Swim-Up Grubunda Embriyo Kalitesi İle Gebelik Oranı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	42
Tablo 4. 10: Embriyo Kalite Gruplarının Gebelik Oranları Açısından Mikro Akışkan Çip Ve Swim-Up Yöntemleri Arasında Karşılaştırılması.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: İnsan Ovaryumlarında Neonatal Yaşamdan 51 Yaşına Kadar Folikül Sayısındaki Varyasyonlar.....	3
Şekil 2.2: Yetişkin İnsan Overlerinin Fotomikrografik Kestileri.....	5
Şekil 2.3: Oositlerin Morfolojik Değerlendirilmesi.....	8
Şekil 2.4: Erkek Genital Sisteminin Bileşenleri.....	9
Şekil 2.5: Seminifer Tübül Duvarında Spermatogenik Hücreler İle Sertoli Hücrelerinin Yerleşimi.....	10
Şekil 2.6: Olgun Bir Spermiyumun Yapısı.....	14
Şekil 2.7: Döllenenmiş Oosit Görüntüleri.....	18
Şekil 2.8: İcisi Sonrası Merkezi Yerleşimli Üç Pronukleus İçeren Bir Oosit.....	18
Şekil 2.9: 2 Ve 3. Gün Embriyoların Mikroskop Görüntüleri.....	23
Şekil 2.10: 2. Gün İnsan Embriyolarının Morfolojik Varyasyonları.....	23
Şekil 2.11: 2. Gün Embriyoları Ve 3. Gün 6 Hücreli Embriyonun Mikroskop Görüntüleri.....	24
Şekil 2.12: Blastokist Embriyosunun Gelişim Evreleri.....	26
Şekil 2.13: 5. Gündeki Embriyoların Mikroskop Görüntüleri.....	27
Şekil 2.14: Geliştirilmiş Neubauer Hemositometresi.....	32
Şekil 2.15: İnsan Spermatozoasının Bazı Anormal Formlarının Şematik Resmi.....	32
Şekil 2.16: Mikro Akışkan Çip Yöntemine Göre Spermilerin Hazırlanması.....	35

KISALTMALAR LİSTESİ

- IVF: *In Vitro* Fertilizasyon
YÜT: Yardımla Üreme Teknikleri
OMI: Oosit Maturasyon İnhibitörü
GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
FSH: Folikül Uyarıcı Hormon
LH: Luteinizan Hormon
hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin
OPU: Oosit Toplama
TFF: Total Döllenme Defekti
ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
OAF: Oosit Aktive Edici Faktör
CCC: Kumulus-Korona Kompleksi
MII: Metafaz 2
OAT: Oligo-Asteno-Teratozoospermi
NPB: Nuklear Prekürsor Cisimcikler
PN: Pronukleus
1 PN: Bir pronukleus
3 PN: Üç pronukleus
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Tüp Bebek Tedavisinde Mikro Akışkan Çip (Sperm Chip) Ve Yüzdürme (Swim Up) Yıkama Yöntemlerinin Embriyo Gelişimine Ve Gebeliğe Etkisi

Amaç: Tüp bebek tedavilerinde spermin hazırlanması en önemli aşamalardan biridir. Tekrarlayan başarısız tüp bebek denemesi olan hastalarda sperm hazırlama yöntemlerinden olan swim-up ve mikro akışkan çip yöntemlerinin embriyo gelişimi ve gebelik oluşumu üzerine etkilerini incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Sebebi bilinmeyen infertilite ve tekrarlayan başarısız tüp bebek denemeleri olan 120 çift çalışmaya dahil edildi. Semen örneklerinde swim-up ile mikro akışkan çip yöntemleri kıyaslanarak sperm konsantrasyonu, sperm hareketlilik ve progresif hareketlilik, kadın yaşları ve tüm bu değişkenlerin embriyo kalitesi ve gebelik oranları üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Bulgular: Mikro akışkan çip ve swim-up gruplarında kadınların yaş ortalamaları, toplanan oosit sayıları, sperm hareketliliği, sperm progresif hareketliliği, transfer edilen embriyo kaliteleri ve gebelik görülme oranları açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Sperm konsantrasyonunun, swim-up grubunda mikro akışkan çip grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0,01$). A, B ve C embriyo kalitesine göre mikro akışkan çip ve swim-up grupları arasında kadınların yaşları açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Swim-up grubundaki gebelik görülen kadınların yaş ortalaması, mikro akışkan çip grubundakilerden anlamlı düzeyde yüksektir ($P<0,05$). Mikro akışkan çip ve swim-up grupları kendi içinde embriyo kalitesi ile gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($P>0,05$). Hem A kalitedeki hem de B ve C kalitedeki embriyoların olduğu grupta gebelik oranları açısından her iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$).

Sonuç: Mikro akışkan çip metodu, swim-up yöntemine göre bir üstünlük sağlamamıştır. Swim-up yöntemi, mikro akışkan çip yöntemine göre ileri yaş grubundaki kadınlar için gebelik oranı açısından daha yararlı bir yöntem olduğunu düşündürmektedir. Embriyo kalitesi açısından her iki yöntem arasında gebelik oranları açısından bir farklılık gözlemlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Embriyo kalitesi, sperm konsantrasyonu, swim-up, mikro akışkan çip, gebelik

Buse AYYILDIZ, 2022

ABSTRACT

The Effect of Microfluidic Chip (Sperm Chip) and Swim Up Washing Methods on Embryo Development and Pregnancy in IVF Treatment

Objective: Preparation of sperm is one of the most important steps in IVF treatments. It was aimed to examine the effects of swim-up and microfluidic chip methods, which are sperm preparation methods, on embryo development and pregnancy formation in patients with repeated failed IVF attempts.

Materials and Methods: 120 couples with infertility of unknown origin and repeated unsuccessful IVF attempts were included in the study. By comparing swim-up and microfluidic chip methods in semen samples, sperm concentration, sperm motility and progressive motility, female ages and the effects of all these variables on embryo quality and pregnancy rates were investigated.

Results: There was no significant difference in the microfluidic chip and swim-up groups in terms of the mean age of the women, the number of oocytes collected, sperm motility, sperm progressive motility, transferred embryo quality and pregnancy rates ($P>0.05$). Sperm concentration was found to be significantly higher in the swim-up group than in the microfluidic chip group ($P<0.01$). There was no significant difference between the microfluidic chip and swim-up groups according to the embryo quality of A, B and C, in terms of age of the women ($P>0.05$). The mean age of pregnant women in the swim-up group was significantly higher than those in the microfluidic chip group ($P<0.05$). No statistically significant correlation was found between embryo quality and pregnancy rates in microfluidic chip and swim-up groups ($P>0.05$). There was no significant difference between the two methods in terms of pregnancy rates in the group with both A quality and B and C quality embryos ($P>0.05$).

Conclusion: The microfluidic chip method did not provide an advantage over the swim-up method. The swim-up method suggest to be a more beneficial method in terms of pregnancy rate for women in the advanced age group compared to the microfluidic chip method. We did not observe any difference in terms of pregnancy rates between the two methods in terms of embryo quality.

Keywords: Embryo quality, sperm concentration, swim-up, microfluidic chip, pregnancy

Buse AYYILDIZ, 2022



1. GİRİŞ

İnfertilite bir çiftin 12 ay veya daha uzun süre boyunca hiçbir korunma yöntemini kullanmadan düzenli cinsel ilişki girmesine rağmen gebelik elde edilememesi durumundaki bir hastalık olduğu ifade edilmiştir. Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'inde infertiliteye rastlanır. İnfertilitenin sıklığı ve nedenleri bir toplumdan diğerine farklılık gösterebilir. Açıklanamayan infertilite; infertil çiftler arasında en yaygın tanılardan biridir.

In Vitro Fertilizasyon (IVF) yöntemi kullanılarak 1978 yılında, oosit ve spermatozoonun bir araya getirilerek oluşan embriyonun transferi sonucunda ilk tüp bebek dünyaya gelmiştir. Bu gelişmenin sonunca IVF alanında birçok çalışmaların ve tekniklerin geliştiği ifade edilmiştir. Günümüzde infertil çiftler yardımla üreme teknikleri (YÜT) ile çocuk sahibi olabilmektedir.

Kaliteli spermatozoon seçimi için birçok farklı yöntem geliştirildiği ifade edilmiştir. Spermilerin yardımla üreme tekniklerinde kullanılabilmesi için santrifüj yapılması ve pelletin süspansiyon halinde olması gerekir. Swim-up yönteminde spermatozoonlar kendi hareket yeteneği ile semenden ayrıldığı ifade edilmiştir. İmmotil spermatozoonların motil spermatozoonlara zarar verebildiği belirtilmiştir (Oğuz Kabayel, 2019). Santrifüj işlemi yapmadan iyi kalitede spermatozoonlar elde etmek için mikro-akışkan çip yöntemlerinin geliştiği ifade edilmiştir. Mikro-akışkan teknolojide sadece spermatozoonların kendi hareketliliği kullanılır. Mikro-akışkan sistemde ön işlem basamağı olmadan likefiye halde olan semen örneği kullanılmaktadır. Literatürde en hızlı ve serbest oksijen radikallerine en az maruz kalan spermatozoonların ayrıştırılmasında kullanılmasının amaçlandığı bildirilmiştir (Aydın Deniz, 2017).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İnfertilite

İnfertilite en az 12 ay veya daha fazla süre boyunca gebe kalınmaması durumundaki hastalık olduğu bildirilmiştir. Bu süre gebelik isteyen çiftlerde bir menstruel siklusta gebe kalma oranının %20-25 olduğu kanıtlara dayanmaktadır. Çiftlerin % 30-40'ında erkek, % 40-50'sinde ise kadın infertiliteden sorumludur. Çiftlerin %10-15'inde ise günümüzdeki mevcut standart tanısal testler sonucunda açıklanamayan infertilite tanısı konduğu bilinmektedir (Ercan, 2015).

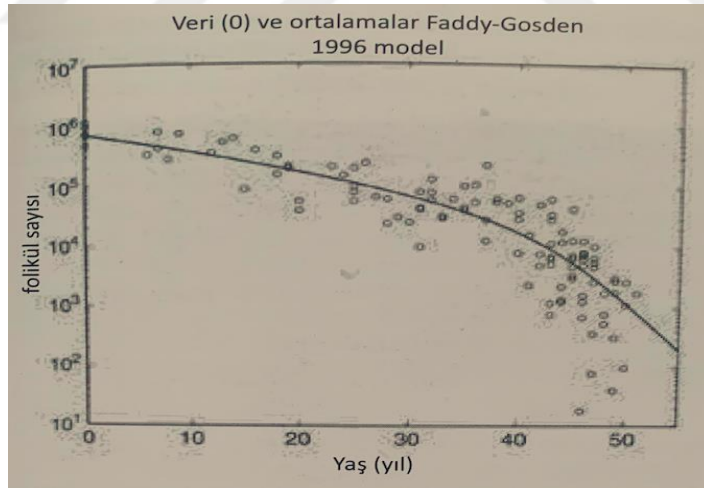
Kadınların her siklusunda yalnızca %25 gebelik şansı olduğu belirtilmiştir. 20-25 yaşlarındaki kadınlarda fertilité en üst düzeydedir. 35 yaşından sonra ise kaliteli oosit sayısı azalır, 40 yaşından sonra minimal düzeydedir. 20-30 yaşlarındaki erkeklerde kaliteli sperm sayısı en üst düzeydedir. 40 yaşından sonra kaliteli sperm sayısı azalır (Açikgöz, 2019).

2.2 Oogenez

Primitif germ hücreleri önce oogonia'lara ve daha sonra olgun oositlere dönüşüm sürecini tanımlar. Primordial germ hücreleri dişi gonadlara ulaştıktan sonra, önce oogonialara farklılaşırlar ve daha sonra bir seri mitotik bölünme ile çoğalırlar. Üçüncü ayın sonunda oogonialardan primer oositler oluşur. Primer oositler tek tabaka yassı foliküller hücre tabakası ve etrafında ovarian stroma hücrelerinden oluşan konnektif doku ile çevrelenmiş olup bu yapı primordial folikül olarak adlandırılır.

Oluşan primer oositlerde 1. mayotik bölünme başlar, ancak bu oositler seksüel matüritenin ve menstruel siklusların başladığı puberteye kadar mayoz bölünmenin profaz evresinde (dictyotene) kalırlar. Bunda primer oositlerin çevresindeki foliküler hücrelerden salgılanan ve oositin mayotik bölünmenin bu aşamasında kalmasını sağlayan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) olarak adlandırılan bir maddenin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu süreçte oogoniaların çoğu mitoz ile çoğalırken bir kısmı daha büyük olan primer oositlere dönüşmektedir. İntrauterin yaşamın yaklaşık 5. ayı civarında overlerdeki germ hücreleri maksimum bir değere, tahminen 7.000.000'a

ulaşır. Bu evrede başlayan hücre dejenerasyonu ile oogonların çoğu ve bu arada primer oositlerin bir kısmı atreziye uğrayarak yok olur. Yaklaşık 7. ayda oogonların çoğu atretik hale geçerken canlılığını sürdüren primer oositler 1. mayoz bölünme aşamasında kalırlar. Doğumdan hemen sonra tüm primer oositler ilk mayoz bölünmenin profaz aşamasındadır ve puberteye kadar ilk mayoz bölünme tamamlanmaz. Sürekli olan atrezi sonucunda doğumda geriye yaklaşık 700.000-2.000.000 primer oosit kaldığı ve bunların da çoğunluğu ilerleyen zamanda atrezi sonucunda kaybolduğu için pubertede her iki overde yaklaşık 400.000 oosit mevcuttur. Puberteden sonra erkeklerde primer spermatozoidlerin üretiminin devam etmesine karşın kadınlarda doğumdan sonra primer oositin oluşumu söz konusu değildir ve bu sebeple kadınlar overlerinde belirli bir oosit rezervi ile dünyaya gelmektedirler. Çeşitli olayların sonucunda pubertenin başlaması ile kadınlarda menstruel ve ovarian sikluslar başlar ve hipotalamus, hipofiz, overler, uterus, fallop tüpleri, vajina ve meme bezleri arasındaki etkileşimler ile üreme sistemi gebeliğe hazırlanır.

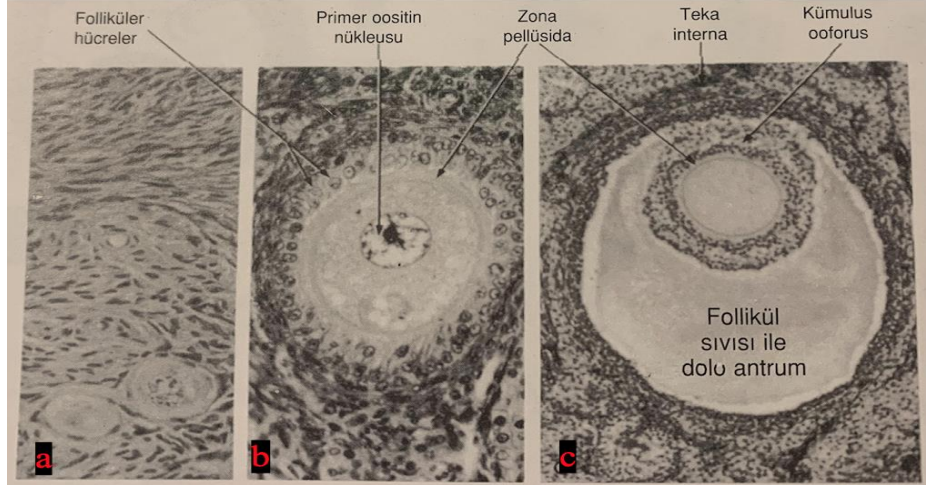


Şekil 2.1: İnsan ovaryumlarında neonatal yaşamdan 51 yaşına kadar folikül sayısındaki varyasyonlar

(Elder., Dale, 2013) İn-Vitro Fertilizasyon kitabından alınmıştır.

Puberteyi başlatan olaylar sonucunda hipotalamustaki nörosekretuar hücrelerden salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH, Gonadotropin Releasing Hormone) hipotalamohipofizer portal dolaşım aracılığı ile hipofiz bezinin ön lobundan over üzerine etkili olan ve siklik ovarian değişiklikleri başlatan folikül uyarıcı (FSH; Follicle Stimulating Hormone) ve luteinizan (LH; Luteinizing Hormone) hormonların salgılanmasını sağlar. Bu iki hormon overlerdeki siklik değişikliklerin uyarılmasını ve kontrolünden (ovarian siklus) sorumludur (Vicdan ve Işık, 1999). FSH overlerde ovarian foliküllerin gelişimini ve foliküler hücrelerden östrojen salgılanmasını uyarırken; LH sekonder oositte 1. mayotik bölünmenin tamamlanmasını, ovülasyonun tetiklenmesini ve oluşan korpus luteumdan progesteron salgılanmasını sağlar.

Her bir ovarian siklusta salgılanan FSH'nın etkisi ile 5-15 primordial folikül olgulaşmaya başlar, büyüklüğünde artış olur, çevreleyen tek sıra yassı epitel, küboid ve çok tabakalı granüloza hücrelerine dönüşür ve primer folikül oluşur (Vicdan ve Işık, 1999). Granüloza hücreleri ile onları çevreleyen stroma arasındaki bazal membran teka folikülü olarak adlandırılır. Aynı zamanda granüloza hücrelerinden veya olasılıkla oositin kendisinden salgılanan glikoprotein yapısındaki zona pellusida oositin yüzeyini kaplar. Folikülün büyümeye devam etmesi için teka hücreleri sekretuar hücreleri içeren bir iç tabaka (teka interna) ve fibroblast hücrelerini içeren konnektif dokudan oluşan bir dış tabaka (teka eksterna) olmak üzere organize olur. Gelişimin sürmesi ile granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu bir boşluk şekillenerek antrumu oluşturur ve bu aşamada folikül sekonder folikül olarak adlandırılır (Vicdan ve Işık, 1999). Zamanla antrum belirgin derecede büyür ve oositi çevreleyen granüloza hücreleri sağlam kalarak antrumdan ayrılır ve kumulus ooforusu oluşturur. Olgunlaşma aşamasına gelen folikül bu süreçten sonra Graaf veya tersiyer folikül olarak adlandırılır. Graff folikülü çevreleyen teka interna, kan damarları tarafından zengindir ve steroid sekresyonunu sağlar, destek görevi yapan teka eksterna ise ovarian stroma ile yakın ilişkidir.



Şekil 2.2: Yetişkin insan overlerinin fotomikrografik kestileri

- a) Primer oositleri içeren iki primordial folikül b) zona pellüsida ve foliküler hücrelerle çevrili primer oosit içeren gelişen folikül c) matür folikül

(*In Vitro* Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar kitabından alınmıştır.)

Her bir ovarian siklusta bir çok primordial folikül gelişmeye başladığı ve bunun sonucunda olgunluk aşamasına ulaşan folikül veya foliküller tespit edilmiştir. Diğerlerinin ise atreziye uğradığı ve sonucunda atretik folikül oluştuğu ifade edilmiştir. Folikülün maturasyona ulaşması ile ve bu arada folikül hücrelerinden salgılanan östrojenin etkisi ile endojen LH salgılanması uyarılır ve primer oosit ilk mayoz bölünmesini tamamlar. Bu birbirine eşit olmayan iki kardeş hücrenin oluşumu ile sonuçlanır.

Her biri çift yapılı 23 kromozom içeren bu hücrelerden büyük olanı sekonder oositir ve sitoplazmanın hemen tümünü alır, diğer küçük olanı ise birinci kutup cisimciğidir. Birinci kutup cisimciği zona ile oosit membranı arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. Böylece ilk mayotik bölünme hemen ovulasyondan önce gerçekleşir. Siklus ortasında görülen endojen LH piki ile ovulasyon gerçekleştikten sonra oositin 2. mayotik bölünmesinin tamamlanması oositin fertilize olmasına bağlıdır. Fertilizasyon gerçekleşmezse oosit 24 saat içerisinde dejenere olurken, fertilizasyonun gerçekleşmesi durumunda DNA replikasyonu olmaksızın hücre ikinci mayotik bölünmesini tamamlar.

Primer oosit LH etkisi ile ilk mayotik bölünmesini tamamlarken aynı zamanda over yüzeyinde bir çıkıntı oluşur ve bu çıkıntının en uç noktasında avasküler bir alan belirir (stigma). Over yüzeyindeki bu lokal zayıflama bölgesinden artan folikül içi basınç, prostaglandinler tarafından uyarılan düz kasların kasılması ve çeşitli enzimlerin etkisi ile foliküler sıvı sızıntısı başlar ve daha sonra bu belirginleşerek foliküler sıvı, oosit ve onu çevreleyen granuloza hücreleri overlerden atılır (ovulasyon).

Ovulasyonu izleyerek folikül duvarında kalan granuloza hücreleri ve teka interna hücreleri vaskülarize olur ve LH etkisi ile luteal hücrelere dönüşerek korpus luteum oluştururlar ve progesteron sekresyonu başlatılır. Ovulasyon öncesi gelişen foliküllerden salgılanan östrojenin etkisi ile proliferasyonuna uğrayan endometrium, ovulasyondan sonra salgılanan progesteronun etkisi ile sekretuar faza geçerek implantasyona hazırlanır (Gökçimen ve Temel, 2009).

Fertilizasyonun gerçekleşmediği durumda ovulasyondan yaklaşık 9-10 gün sonra korpus luteum dejenere olarak fibrotik bir doku olan korpus albicansa dönüşür ve eş zamanlı azalan progesteron sekresyonuna bağlı olarak implantasyon için hazırlanan endometriumun menstruel kanama ile dökülür (menstruasyon). Fertilizasyonun gerçekleştiği durumda ise gelişen embriyodaki trofoblastik hücrelerden salgılanan insan koryonik gonadotropininin (hCG; Human Chorionic Gonadotropin) etkisi ile korpus luteum dejenerasyondan kurtulur ve gelişimini sürdürerek gebelik korpus luteumuna dönüştürülür. Gebelik korpus luteumunun fonksiyonları gebeliğin 3. ayının sonuna kadar sürer ve daha sonra gerileyerek görevini geliştirmekte olan plasentaya bırakır (Çelikkalkan Şençoban ve Gaye Arzu, 2018).

2.3 Oosit Toplama Prosedürü (Oosit Pick Up; Opu)

Louise Brown'ın doğması ile birlikte infertilite tedavisinde yeni bir dönemin başladığı ifade edilmiştir. IVF tekniklerinde çok önemli gelişmeler yaşandığı ve yeni gelişmelere açık bir konu olarak güncelliğini korumakta olduğu belirtilmiştir (Asyalı vd., 2010).

İlk IVF bebeği naturel siklusta gelişen tek bir oositin laparoskopik yöntemle aspire edilip inseminasyonun hemen gerçekleştirilmesinden sonra gelişen embriyonun transferiyle dünyaya gelmiştir. Bugün ise dünyanın hemen her yerindeki IVF merkezlerinde kontrollü ovaryan stimülasyon protokolleriyle çok sayıda oosit elde edilmektedir.

2.4 Morfolojik Olarak Oositlerin Değerlendirilmesi

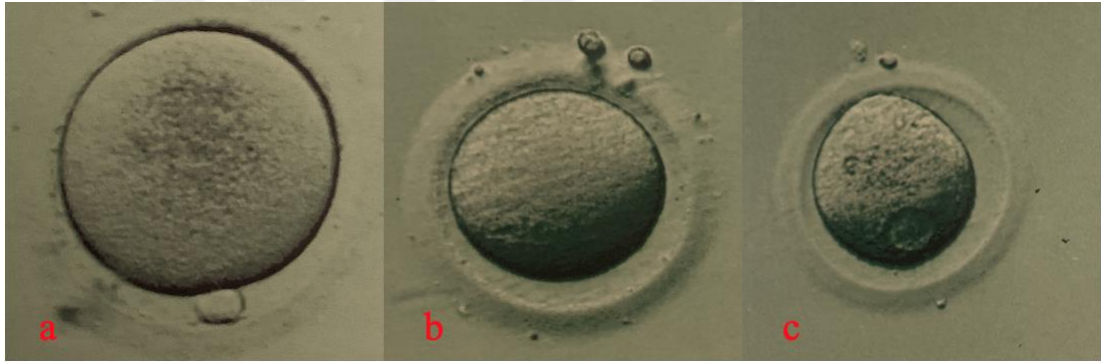
IVF'de total dölleme defekti (Total Fertilization Failure, TFF) ile karşılaşıldığında önceden sperm parametreleri etkili olduğu düşünülürken; fertilizasyon kontrolünde döllemeyen oositlerin bir bölümünün hala immatür olduğu gözlemlenmesi sonucu, oositlerde matürasyon değerlendirmesinin ve inseminasyon zamanlamasının önemli olduğu bildirilmiştir. Klasik IVF'de döllememenin nedeni sperm penetrasyonun gerçekleşmemesi şeklinde ifade edilmesine karşın, İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonunda (ICSI) da bir kısım oositlerin döllemeyişi oosit aktive edici faktörün (Oocyte Activating Factor, OAF) yetersizliğine bağlanmış olduğu tespit edilmiştir (Delilbaşı, 2008).

IVF'de fertilize olmamış oositlerde morfolojik anomalilerin olduğu ifade edilmiştir (Delilbaşı, 2008). IVF'den farklı olarak; ICSI'de oositlerin etrafındaki kumulus-korona hücrelerinin uzaklaştırılması ile birlikte oositlerin yapısal özelliklerini ve morfolojik özelliklerini anlamak için yararlıdır.

2.5 Oositlerin Kumulus-Korona Kompleksine Göre Sınıflandırılması

Klasik IVF’de oositlerin morfolojik özellikleri, çevrelerindeki kumulus-korona hücrelerinden dolayı gözlenemez. Ancak oositlerin matürasyonlarını ve dolayısıyla inseminasyon zamanlamasını saptayabilmek için kumulus-korona kompleksindeki (Cumulus-Corona Complex, CCC) hücrelerin miktar, dağılım ve düzenlerine göre değerlendirilir.

IVF’den farklı olarak ICSI işleminden önce oositin etrafındaki hücreler mekanik ve kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılır. Bunun sonucunda yapısal özellikleri ve oosit maturasyonu daha net olarak gözlemlenebilir. İyi kalitedeki bir Metafaz 2 (MII) oosit; şeffaf veya hafifçe granüler sitoplazmaya sahip, perivitellin aralığın dar ve zona pellusidanın renksiz görüldüğü bir hücredir (Delilbaşı, 2008).

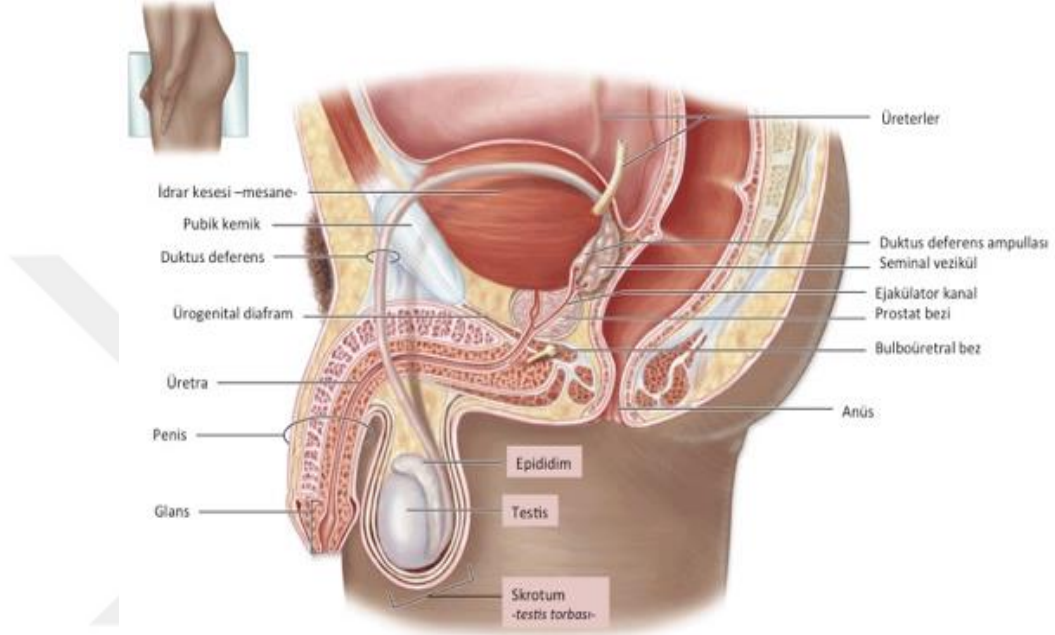


Şekil 2.3: Oositlerin morfolojik değerlendirilmesi

- (a) Metafaz II oosit. (b) Kutup cisimciği oluşmayan oosit. (c) Germinal vezikül içeren immatür (GV) oosit

2.6 Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi spermatozoonun beslenmesinden, devamlı üretimi ve geçici depolanmasından, erkek cinsiyet hormonlarının sekresyon ve sentezinden sorumludur (Aslan, 2019).



Şekil 2.4: Erkek genital sisteminin bileşenleri

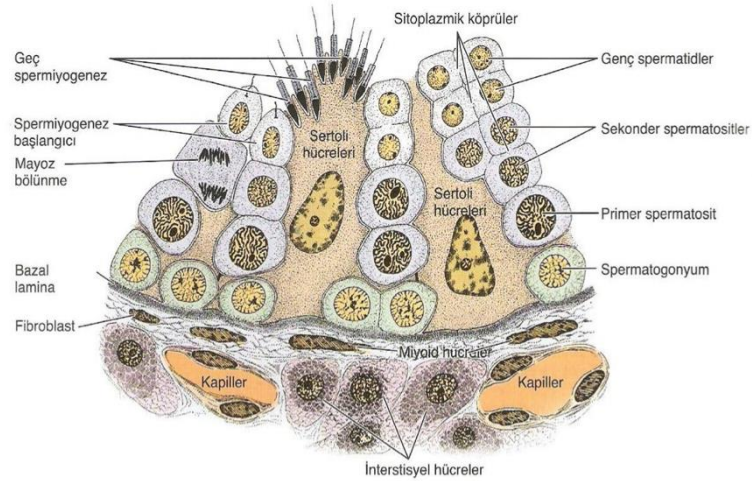
2.6.1 Gonadlar

- Testis:** Penisin her iki yanında yer alır. Sperm üretimi ve testosteron hormonu salgılanması testislerin görevleridir. Testisin hem ekzokrin hem de endokrin salgılama özelliği vardır. Spermatozoon ekzokrin ürün iken, testosteron endokrin üründür. Vücuttaki testosteronun az bir kısmı böbrek üstü bezlerinde üretilirken neredeyse tamamı testislerde üretilir.
- Seminifer tübüller:** Holokrin tipte salgılama yapan testisin salgılayıcı dokusudur. İçerisinde spermium üretilir. Her bir testiste yaklaşık olarak 250 lobül vardır. Herbir lobülde katlanmış seminifer tübüller mevcuttur. Bu tübüllerin epitelyum yapısı başlıca 3 tür hücreyi içinde bulundurmaktadır (Miettinen vd., 1985).

1- Sertoli Hücreleri: Seminifer tübüllerin prizmatik hücreleridir (Akçaoğlu, 2018). Gelişen spermatogenik seri hücrelerinin beslenmesini ve desteklenmesini sağlar. Bariyer oluşturarak spermatogenik hücreleri zararlı etkenlerden korur. Fagositoz ve sekresyon yapar.

2- Spermatogenik (Germ) Hücreler: Seminifer tübülü kaplayan çok katlı epiteli oluştururlar ve 4-8 hücre arasında derinliği olduğu bilinmektedir. Bu hücreler çoğalırlar, şekil değiştirirler ve olgun spermiumları oluştururlar. Spermatogonia olarak isimlendirilen olgunlaşmamış hücrelerin apikal kısımda bulunurlar. Olgunlaşmış hücreler ise tübülün lümen tarafında yer alıp spermatid olarak adlandırılır.

3- Leydig Hücreleri: İnterstisyumda yer alan poligonal, büyük asidofilik boyanan granüllü hücreler olduğu bildirilmiştir. Büyük yağ damlaları taşırlar. Kan kapilleri etrafında 15-20 µm çapında testise özgü hücrelerdir. Testosteron salgılanmasını, sperm üretiminin başlamasını ve spermatogenezin devam ettirilmesini, aksesuar cinsiyet bezlerinin sekresyon faaliyetini ve sekonder seks karakterlerinin gelişimini ve devamlılığı için gereklidir (Kwang W. Jeon, 2004).



Şekil 2.5: Seminifer tübül duvarında spermatogenik hücreler ile sertoli hücrelerinin yerleşimi

2.6.2 Genital kanal sistemi

Testis içindeki genital kanallar, tubuli rekti ve rete testistir. Testis dışındaki genital kanallar; duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus duktuli efferentes, ve uretradır. Bu kanallar testislerden penisin çıkışına dek uzanır (Karagöz Can, 2020).

- a) Epididim: Yarım ay şeklindedir. Baş, boyun ve kuyruk olmak üzere incelenir. Duktuli efferentes baş kısmını, ductus epididimis orta ve kuyruk kısmını oluşturur. Testiste oluşan yeni spermatozoonlar duktuli efferentes aracılığıyla epididime gelip hareket ve dölleme yeteneği kazanırlar.
- b) Duktus deferens (Vas Deferens): Erkek genital boşaltım sisteminin en uzun parçasıdır. Yalancı çok katlı prizmatik epitel hücreler ile döşelidir. Uzun prizmatik hücreler mikrovilluslara sahiptir. Duktus deferensin distal kısımlarında normal olmayan spermatozoonların fagositozunun ve absorpsiyonunun gerçekleştiği kabul edilmektedir (Dinçel, 2019).
- c) Duktus ejakulatoryus: Duktus deferensin ucu vezikula seminalisin kanalı ile birleşerek duktus ejakulatoryusu oluşturur. Kas lifleri duktus ejakulatoryusu sürekli olarak kapalı tutarlar. Ejakülataın boşalması sırasında, duktus ejakulatoryus lümeni açılır. Duktus deferensteki kasların kasılması sonucu spermatozoonlar, duktus ejakulatoryuslardan geçerek uretraya atılır.

2.6.3 Spermatogenez

Spermatogoniumdan spermatozoon oluşumuna kadar geçen evredir. Yaklaşık olarak 74 gün sürer. Süreç üç evrede incelenebilir:

1. Proliferasyon (spermatositogenezis): spermatogonia
2. Redüksiyon bölünmesi (mayoz): spermatositler
3. Farklanma (spermiogenezis): spermatidler

Fötal testiste, primordial germ hücreleri spermatozoal kaynak hücre olan tipA (Ao) spermatogoniumlara farklırlar. Pubertede, spermatogonial hücreler mitoz bölünme ile proliferer olur ve bunu mayoz bölünme, hücreyel yapıların reorganizasyonu ve son olarak da sitoplazmanın fazlasının atılması olayı izler.

Spermatositogenezis

Puberteden sonra seminifer tübüllerin germinal epitelindeki kaynak hücreler (tip A spermatogonia) aralıklarla DNA'larını ikiye katlar ve mitoz bölünme ile bölünür. Her bir mitoz bölünme sonucu iki kardeş hücre olan tip A spermatogonium ve tip B spermatogonium oluşur. İkinci grup hücre lümenine daha yakındır ve mayoz bölünme geçirerek farklılmaya başlar.

Mayoz

Lümene yakın taraftaki hücreler iki mayoz bölünme geçirerek ilk olarak kardeş sekonder spermatositleri meydana getirir ve bunun sonucunda dört tane erken spermatid oluşur. Bir seri farklılaşma evresinden geçirerek mayoz bölünme (redüksiyon bölünme) ile 46 kromozomlu diploid kaynak hücreden (spermatogonium) 23 kromozom içeren haploid gametler meydana gelir. Birinci mayoz sonucunda tip B spermatogoniumlar ($2n:2c$) primer spermatositleri ($1n:2c$) oluştururlar. Bu hücreler de tekrar bölünerek sekonder spermatositleri ($1n:1c$) meydana getirirler. Sekonder spermatositler bu evreyi hızlı geçerek ikinci mayoz bölünmeyi tamamlarlar ve oluşan yeni hücreler spermatid olarak isimlendirilir. Bu hücreler spermatozoonları ($1n:1c$) meydana getirmek üzere maturasyon sürecinden (spermiogenez) geçerler.

Spermiogenez

Spermatidlerin farklılaşması dört evrede gerçekleşir:

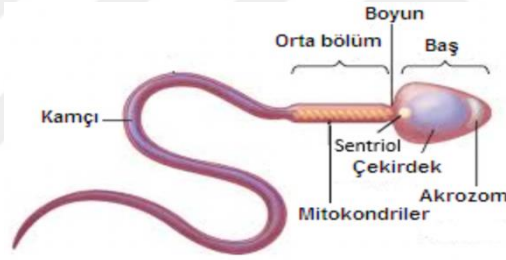
1. Golgi evresi
2. Kep evresi
3. Akrozom evresi
4. Matürasyon evresi

Spermatid çekirdeği haploid kromozom seti içerir. Spermiogenezise girildiğinde, otozomlar rRNA, mRNA ve protein sentezlemeye devam ederler. Bu evrede yuvarlak (round) spermatidler kondanse bir çekirdek ve kuyruğu olan, uzun (elonge) spermatidlere dönüşürler. Bu hücreler mitoz veya mayoz ile tekrar bölünmez, ancak dişi genital kanallarından geçerek oositi fertilize edebilme fonksiyonunu kazanabilmeleri için değişikliğe uğramaları gerekir.

Sperm modelasyonu sertoli hücreleri tarafından düzenlenir ve spermatogenez ilerledikçe hücreler tübül lümenine doğru hareket eder. Spermatogenez süresince hücrelerin gelişme hızı bellidir. Hormonlar gibi dış faktörlerden etkilenmezler. Depolanan mRNA translasyonunun zamanlaması en önemli kontrol noktasıdır.

2.6.4 Spermatozoon yapısı

Spermiyogenez; spermatozoonun oluşması ile son bulur. Olgun bir spermin uzunluğu yaklaşık olarak 60 μm 'dir. Spermatozoon başı yassı olup; 4,5 μm uzunluğunda 3 μm eninde ve 1 μm kalınlığındadır. Kuyruk 45-50 μm uzunluğundadır. Boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 kısma ayrılır (Grudzinskas vd., 2022). Spermatozoonun hareket kazanmasını mikrotübül yapısı sayesinde aksonem sağlar.



Şekil 2.6: Olgun bir spermiyumun yapısı

2.7 Erkek İnfertilitesi Ve Etiyolojisi

2.7.1 Erkek infertilitesi

İnfertilitenin tek başına %20'sinden sorumludur. İnfertil çiftlerin yaklaşık %20-40'ında kalıtsaldır (Milardi vd., 2012). Vakaların %90'ında infertilitenin sebebi sperm üretiminin gerçekleşmemesidir (Kumar ve Singh, 2015).

2.7.2 Erkek infertilitesinin etiyolojisi

Erkek fertilitesinde azalma; genital sistem enfeksiyonlarından, kazanılmış yada konjenital ürogenital bozukluklardan, sktortal ısı artışından, endokrin bozukluklardan, genetik hastalıklardan ve immünolojik faktörlerden kaynaklanabilir (Gorur, 2019). Erkek subfertilitesinin başlıca etiyolojik nedenleri dört ana grupta incelenebilir (O'Flynn vd., 2010).

Primer bozukluklar (Testiküler hastalıklar)	→	% 30-40
Sperm iletimi bozuklukları (Post-testiküler patolojiler)	→	% 10-20
Hipotalamo-Hipofizer bozukluklar (Pre-testiküler nedenler)	→	% 1-2
Sebebi bilinmeyen bozukluklar	→	% 40-50

1. Hipotalamo-Hipofizer bozukluklar (Pre-testiküler nedenler)

Kallman sendromu	Hipotalamik veya hipofizer tümörler (kraniofarengioma, makroadenom)	İlaçlar (GnRH analogları, glukokortikoidler)
Tek gen mutasyonları	İnfiltratif hastalıklar (sarkoidoz, histiyositoz)	Hiperprolaktinemi

2. Primer bozukluklar (Testiküler hastalıklar)

Klinefelter Sendromu	Kriptorsidizm	İlaçlar
Radyasyon	Varikosel	Y Kromozom delesyonları
Tek gen mutasyonları	Enfeksiyonlar	Çevresel faktörler

3. Sperm iletimi bozuklukları (Post-testiküler patolojiler)

Young sendromu	Doğuştan vaz deferens yokluğu
Vaz deferens tıkanıklığı (klamidya, tüberküloz)	Kartagener sendromu (primer siliyer diskinezi)
Vazektomi	Epididimal tıkanıklık veya fonksiyon bozukluğu

2.8 Embriyonik Gelişim

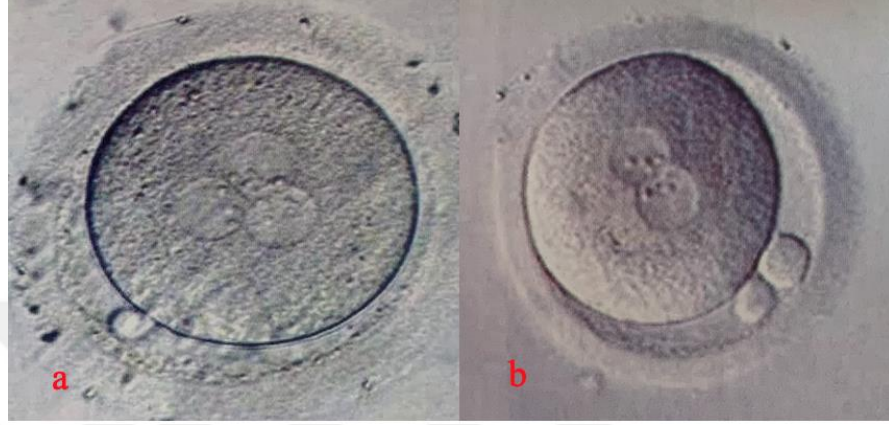
2.8.1 Normal embriyonik gelişim

Fertilize olmuş oosit zigot adını alır. Zigot sferik, küçük ve vertikal eksen boyunca polarizasyon gösteren bir hücredir. Zigot mitotik aktivasyon ile bölünmeye başlar ve hücre bölünmesi sonucu blastomerler oluşur.

Fertilizasyondan sonra iki haploid pronukleusun DNA'larını ikiye katlamalarıyla mitoz bölünme başlar. İnseminasyondan 20-34 saat sonra iki pronukleus birleşip singami oluşur. 35,6. saatte sitoplazma ikiye bölünür ve iki diploid blastomer meydana gelir.

Spermatozoon ve oosit döllenmesi sonucu, sentriyol ve mikrotübüller erkek ve dişi pronukleuslarını bir araya getirir ve inseminasyondan yaklaşık 16-18 saat sonra oosit sitoplazmasının ortasında pronukleuslar gözlenir (Delilbaşı, 2007). Pronukleusların içindeki nukleolus ve nuklear prekürsor cisimcikler (Nucleolar Precursor Body, NPB), yerleşim yerlerine göre embriyonun gelişimi ve kromozomal özellikleri hakkında bilgi verir.

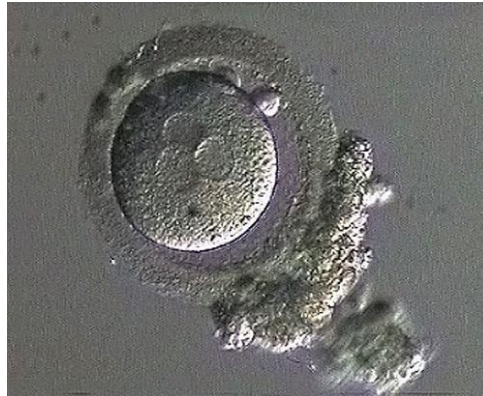
Normal fertilize olmuş oositlerde, iki pronukleusun birleşmesinin ardından, kromozomlar kalın bir iğ boyunca dizilirler ve singami oluşur. Sentriyoller kromatidleri çeker, her iki kutup arasında gerilme olur ve inseminasyonu takiben ortalama 35,6 saate zigot, iki hücreli bir embriyo haline gelir (Delilbaşı, 2007).



Şekil 2.7: Döllenmiş oosit görüntüleri

(a)Normal fertilizasyonda görünen 2 kutup cisimciği ve 2 pronukleus oosit. (b) Döllenmiş oosit faz kontrast görüntüleri.

Anormal fertilizasyon genelde ikinci polar cisimciğin kaldığı anormal veya fragmente pronukleus (PN) içeren oositler olarak 2 grup altında incelenir. Değişik kombinasyonları olabilir. En sık görülen fertilizasyon anormallikleri 1PN ve 3PN'dir (Işık ve Vicdan, 1999a).



Şekil 2.8: ICSI sonrası merkezi yerleşimli üç pronukleus içeren bir oosit.

1- Bir pronukleus (1 PN): Tek bir pronukleusun olması durumudur. İki pronukleusun oluşması sonucu fertilizasyonun başarılı olduğunu bildirirse de görülmemesi durumu fertilizasyon başarısızlığına gösterge değildir. Partenogenetik aktivasyon yada fertilizasyonla ilişkili olayların zamanlamasında bir gecikmenin göstergesidir (Elder ve Dale, 2014a).

2- Üç pronukleus (3 PN, triploidi): Genellikle oositlerin immatür veya postmatür olmasının bir sonucudur. 3 PN'den gelişen embriyoların transfer edilmesi uygun görülmemektedir.

Nedenleri;

- Polispermiye karşı blokajın yetersiz olması
- 2 nukleuslu bir spermatozoanın tek nukleuslu normal bir oositi penetre etmesi
- 2 nukleuslu bir oositin tek nukleuslu normal bir spermatozoon ile penetrasyonu
- Oositin birinci ve ikinci polar cisimciğinin retansiyonu
- Kötü kültür koşullarının varlığı veya ICSI tekniğinde yetersizlik nedeniyle olabilir.

2.8.2 Embriyo gelişiminin değerlendirilmesi ve embriyoları sınıflandırma

Bölünmeye devam eden embriyoların gelişim evrelerinin ve morfolojik özelliklerinin değerlendirildiği evredir. Embriyoların morfolojik özellikleri inverted mikroskopta değerlendirilir (Işık ve Vicdan, 1999b):

- Fragmantasyonun varlığı ve yüzdesi
- Embriyonun blastomer morfolojisi
- Embriyonun blastomer nukleusları
- Embriyonun blastomer sayısı
- Embriyonun blastomer büyüklüğü

Embriyo gelişiminin değerlendirilmesinde; embriyo blastomer sayısı ve fragmantasyon oranı en önemli iki kriterdir.

2.8.3 Fragmantler

İnsan embriyolarında fragmantasyon, *in vitro* gelişen embriyoların %75'ini etkileyen genel bir durum olup fragmantasyona yol açan sebeplerin kültür koşulları, foliküler stimülasyonun etkisi veya insan gelişiminin karakteristik bir özelliği sonucu olup olmadığı ifade edilmiştir. Yaygın fragmantasyonun implantasyon başarısızlığı ile ilişkisi olduğu söylenmektedir; fakat fragmantasyon derecesi ile embriyo gelişim potansiyeli arasındaki ilişki henüz kanıtlanmış değildir.

Alikani ve arkadaşları tarafından %15'ten az ve fazla fragmantasyonu olan embriyoların blastokist kültürü yapılmıştır (Yıldırım, 2015). Bu kültürde %15'ten az fragmantasyonu olan embriyolarla karşılaştırıldığında daha az morula, daha az kavite ve daha az blastokist oluşturduğu ifade edilmiştir.

Alikani ve Cohen, hücre fragmentasyonu ve implantasyon potansiyeli arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla insan embriyolarında hücre fragmentasyon paterni analizini kullanmış ve sadece fragmentasyon derecesinin değil fragmentasyon modelinin de implantasyon potansiyelini belirlediğini bildirmiştir. 3. gün gözlenebilen 5 farklı fragmentasyon modeli belirlendiği ifade edilmiştir (Elder ve Dale, 2014b):

Tip I: Perivitellin aralıkta hacminin <math><5\%</math>’inde fragment bulunması

Tip II: Bir veya iki hücreye ilişkili küçük, tek yerde lokalize fragment bulunması

Tip III: Çok hücreyle ilişkili küçük, dağınık fragmentler gözlenmesi

Tip IV: Perivitellin aralık boyunca dağılmış ve bir çok farklı boyutlarda hücre ile ilişkili yaygın, dağınık fragmentler görülmesi

Tip V: Kontraksiyon ve granüler sitoplazma ile ilişkili, hücre sınırlarının görülmediği, dejenere gözükten, perivitellin aralık boyunca fragment görülmesi.

Bazı embriyolar belli bir fragmentasyon modeli göstermezler. Fragmentasyonun kesin sebebi henüz bilinmemesine karşın; yüksek sperm sayısı ve buna bağlı yüksek serbest radikal seviyeleri, sıcaklık, pH şoku ve stimülasyon protokolleri olabilir.

2.8.4 Embriyo sınıflandırma: Bölünme aşamaları

Kalite 1/A:

- Eşit boyda, düzenli yuvarlak blastomerler
- Orta derecede refraktilite (çok koyu olmayan)
- Bozulmamış zona
- Fragmentsız veya çok az (<math><10\%</math>) fragment olması

Kalite 2/B:

- Eşit olmayan ve düzensiz şekilli blastomerler
- Refraktilitede hafif varyasyon
- Blastomerlerde %10'dan fazla az fragmantasyon

Kalite 3/C:

- Blastomerlerde %50'den daha az fragmantasyon
- Kalan blastomerler en azından uygun durumda olmalı (Grade 2)
- Hücre yaşayabilirliği ile ilişkili refraktilite
- Bozulmamış zona pelusida

Kalite D:

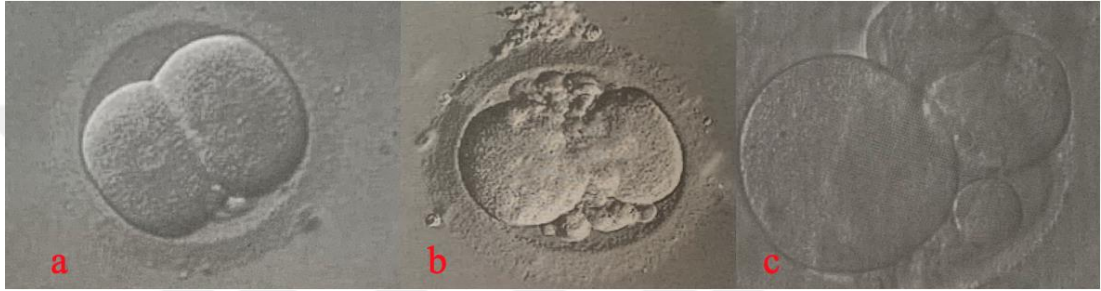
- Blastomerlerde %50'den fazla fragmantasyon
- Refraktilitede büyük çeşitlilik
- Kalan blastomerler yaşayabilir görünmeli

Kalite 5:

- 2.gün iki pronukleuslu zigot (1.gün fertilizasyon ve yeniden inseminasyonda gecikme)

Kalite 6:

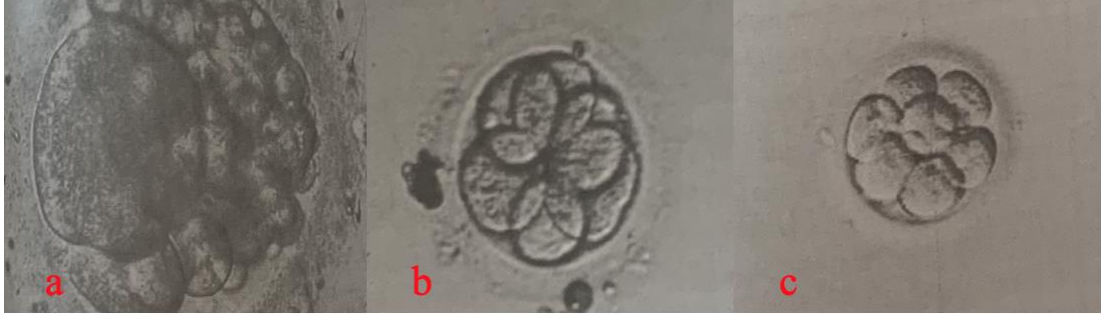
- Cansız: fragmantlı, lizize uğramış, kontraksiyonu olan veya koyu renk blastomerler
- Cansız hücreler



Şekil 2.9: 2 ve 3. gün embriyoların mikroskop görüntüleri (a) Erken bölünme aşamasındaki insan embriyolarında morfolojik varyasyonlar. (b) Fragmentsız, 2 hücreli 2. gün embriyosu. (c) 3. gün kalite 3 embriyosu.



Şekil 2.10: 2. gün insan embriyolarının morfolojik varyasyonları (a) Büyük bir dominant blastomer içeren, farklı boyutlarda blastomerlere sahip 2. gün embriyosu. (b) Bir blastomerinde büyük vakuoller gözüken, kalite 2/3 2. gün embriyosu. (c) 2. gün 4 hücreli kalite 1 embriyo.



Şekil 2.11: 2. gün embriyoları ve 3. gün 6 hücreli embriyonun mikroskop görüntüleri
(a) 2. gün kalite 3 embriyo. (b) 2. gün kalite 4 embriyo (c) 3. gün 6 hücreli kalite 1 embriyo

2.8.5 Blastokist transferi

5. ve 6. günde transfer gerçekleştiğinde endometrium ile embriyo arasında daha iyi etkileşim olduğu ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra zigotik genomun aktivasyonu sonrası genetik veya metabolik defektler yüzünden gelişemeyen embriyoların elimine olmasını sağlar. Blastokist kültürü için önemli bir koşul optimum IVF laboratuvarı ortamıdır; eğer 2. ve 3. gün implantasyon oranları zaten yeterli değil ise kültür süresini uzatmak avantajlı değildir. Klivaj aşamasında ayrıntılı morfolojik değerlendirme ile birlikte 3. gün embriyo transferi yapılmasının blastokist transferi ile aynı başarıyı sağladığı tespit edilmiştir (Elder ve Dale, 2014c).

Blastokist transferinin olası faydaları (Glujovsky ve Farquhar, 2016);

- Gerçek embriyo canlılığı embriyonik genom aktivasyonu sonrası değerlendirilebilir.
- Kısıtlı gelişim potansiyeli olan embriyolar elimine edilebilir.
- Uterus ve embriyonun evreleri senkronize edilerek embriyo üzerindeki hücresel stres azaltılır.
- Embriyonun hiperstimüle uterus ortamına maruz kalması azatılır.
- Olası uterus kasılmaları riski azaltılarak embriyonun dışarı atılma ihtimali minimize edilir.

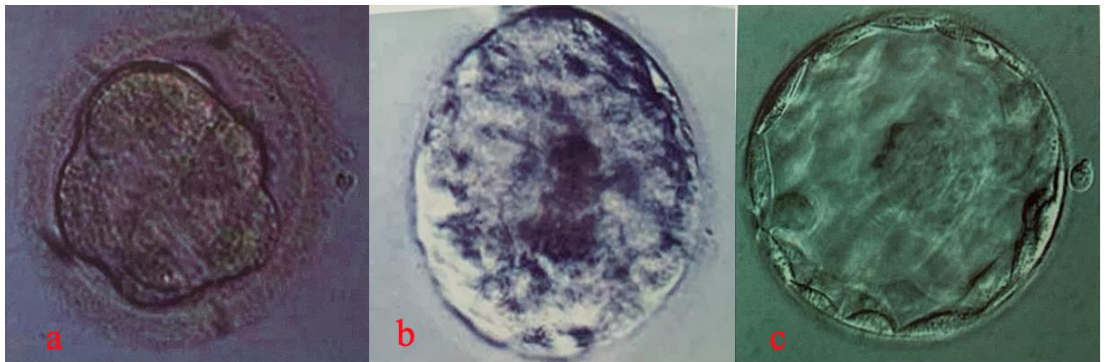
- Klivaj aşamasında embriyo biyopsisi yapılarak sonuçlar hazır olunca blastokist transferi yapılabilir.
- Yüksek implantasyon oranı: çok sayıda embriyo transfer etme ihtiyacını azaltır.
- Sadece bir veya iki embriyo transfer etmeye ihtiyaç olduğu için çoğul gebelik oranları azalır.

Sağlıklı blastokistlerin seçilme durumunun olması blastokist transferinin başarısında önemli olduğu bildirilmiştir. Blastokistin genişleme, çatlama durumu, iç hücre kütesinin durumu ve trofoektodermin gelişimini göz önüne alarak bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur:

1. Erken blastokist: Blastosel embriyonun hacminin yarısından azını kaplar.
2. Blastokist: Blastosel embriyonun hacminin yarısını veya daha fazlasını kaplar.
3. Tam blastokist: Blastosel embriyonun tümünü kaplar ama zona incelmeye başlamamıştır.
4. Genişlemiş blastokist: Blastosel embriyonun hacminin tamamını kapsar ve zona incelmeye başlamıştır.
5. Çatlamaya hazır (Hatching) blastokist: Trofoektoderm hücreleri zonadan dışarı çıkmaya başlamıştır.
6. Çatlamış (Hatch olan) blastokist: Blastokist zonadan tamamen dışarı çıkmıştır.

İç hücre kütle ve trofoektoderm morfolojisi daha sonra inverted mikroskop altında incelenir.

İÇ HÜCRE KÜTLESİ	TROFOEKTODERM
A. Sıkıca gruplanmış, çok sayıda hücre	A. Birbirine bağlanmış ve epitel oluşturan birçok hücre
B. Gevşekçe bağlanmış az sayıda hücre	B. Gevşekçe epitel oluşturan az sayıda hücre
C. Çok az sayıda hücre	C. Çok az sayıda büyük hücreler



Şekil 2.12: Blastokist embriyosunun gelişim evreleri (a) Blastokist gelişim evreleri. (b) Kompaksiyon gösteren morula. (c) Kavitasyonun erken safhaları.



Şekil 2.13: 5. gündeki embriyoların mikroskop görüntüleri(a) Tam genişlemiş en iyi kalite blastokist, iyi gelişmiş iç hücre kütle ve trofoektoderm, incelmış zona, çatlama (hatching) başlamış. (b) Çatlama gerçekleşen en iyi kalite blastokist. (c) Zonadan çıkmak üzere olan çatlama blastokist.

2.9 Semen Analizi

Semen analizi, erkek hastalarda infertil tanısı koymak için ilk kriterdir. Sperm üretiminde ve üreme sisteminde bir sorun olup olmadığı konusunda semen analizi yardımcı olur. Semen analizi değerleri 1992 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenmiş ve normal semen kalitesi açısından minimum kriter olarak kabul edilmiştir. 2010 yılında kriter olarak kabul edilen değerler güncellenerek yeniden belirlenmiştir. Semen tahlilinde herhangi bir değer düşük çıkarsa istatistiksel olarak gebelik ihtimalinin düşmesine sebep olabilir. Sayı ve hareketliliğin semen değişkenleri içinde fertilité ile daha çok bağlantılı olduğu görülmektedir.

Tablo 2.1: Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği 1999 ve 2010 yılı normal semen parametreleri

PARAMETRE	WHO 1999	WHO 2010
Hacim	≥ 2 ml	≥ 1.5 ml
pH	7.2-8	≥ 7.2
Sperm sayısı (milyon/ml)	≥ 20	≥ 15
Total sperm sayısı (milyon)	≥ 40	≥ 39
Hareketlilik	≥ 50 ileri hareketlilik (a ve b kategorileri)	≥ 40 ileri ve yerinde hareketli
Morfoloji	≥ 30 normal formlar	≥ 4 normal formlar
Canlılık	≥ 75 canlı	≥ 58 canlı
Beyaz küre (milyon/ml)	≤ 1 (1 milyonu aşmamalı)	< 1
İmmünobead testi	<%20 partiküllere tutunan hareketli sperm	<%50 partiküllere tutunan hareketli sperm
MAR testi	<%10 partiküllere tutunan hareketli sperm	<%50 partiküllere tutunan hareketli sperm
Seminal çinko	≥ 2.4 mmol/ ejakülat	≥ 2.4 mmol/ejakülat
Seminal fruktoz	≥ 13 mmol/ ejakülat	≥ 13 mmol/ ejakülat
Seminal nötral glikozidaz	≥ 20 mU / ejakülat	≥ 20 mu/ ejakülat

2.9.1 WHO'ya göre sperm analizi terminolojileri

1. Aspermi: Meninin dışarıya hiç gelmemesi durumudur. Psikolojik açıdan, doğuştan veya sonradan oluşan kanal problemi olanlarda görülebilir.

2. Hipospermi: Semen volümünün 1,5 ml'den daha az olmasıdır.

3. Polizoospermi: Konsantrasyonda 250 milyon/ml'den fazla sperm olma durumudur. Enfeksiyon sonucu olabilir. Polizoospermi hastalarında akrozom aktivitesi düşüktür (Öner, 2020).

4. Ejakulatta likefaksiyon bozukluğu: Semen örneğinin 20 dakika içerisinde 37 derecede çözünmemesi durumudur.

5. Azospermi: Ejakülatta hiç sperm olmamasıdır.

6. Oligozoospermi: Konsantrasyonda 15 milyon/ml'nin altında sperm olmasıdır.

a) Hafif Oligozoospermi: Konsantrasyonda 5-15 milyon/ml'nin arasında sperm olmasıdır.

b) Şiddetli Oligozoospermi: Konsantrasyonda 5 milyon/ml'nin altında sperm olmasıdır.

7. Astenozoospermi: Spermilerin toplam hareket yüzdesinin %40'ın altında olması veya ileri hareketliliğin %32'nin altında olmasıdır.

8. Teratozoospermi: Kruger kriterlerine göre morfolojik olarak uygunluk göstermeyen anormal sayılan spermilerin %4'ün üstünde olmasıdır.

9. Oligoastenoteratozoospermi: Sayı, hareket ve morfolojik kriterlerin hepsinin belirlenen değerlerden düşük olmasıdır.

10. Globozoospermi: Spermilerin yuvarlak başlı olmasıdır. Akrozom neredeyse hiç görülmez.

11. Nekrozoospermi: Semende % 25'ten fazla nektrotik sperm hücresi olmasıdır.

12. Virtual Azospermi: Hastanın ejakülatında farklı zaman aralıklarında sperm görülüp görülmemesi durumudur. Bu nedenle spermiyogram testi yaparken 1 ay ile en az 2 test yapılması önerilir (Uğurlu, 2017).

2.9.2 Sperm motilitesi ve hareketliliğinin değerlendirilmesi

Semen analizinde DSÖ'ün önerdiği sperm hareketliliğini 4 farklı açıdan değerlendiren sistem tercih edilir. Motilite, ejakulattaki progresif hareketli sperm yüzdesi olarak belirtilen ileri doğru hareketli spermilerin veya % 25 hızlı ileri doğru hareketli sperm yüzdesi olarak kabul edilmektedir. WHO sperm hareketliliğini dört sınıfta değerlendirir:

- 1- Hızlı ileriye doğru progresif hareket (+4)
- 2- Yavaş ileriye doğru doğrusal olmayan hareket (+3)
- 3- Yerinde olan hareket (+2)
- 4- Hareketi olmayan anormal (+1).

2.9.3 Makroskopik değerlendirme

Semende ilk olarak likefaksiyon, renk, viskozite, volüm, koku ve pH'ın değerlendirilir (Satar ve Gençdal, 2013) .

Görünüm ve Yoğunluk: Semen kokusuz gri opak görünüme sahip olmalıdır.

Likefaksiyon ve Viskosite: Ejakulat koagülüm şeklindedir ancak 30 dakika içerisinde likefiye olması gerekmektedir. Eğer likefaksiyon gerçekleşmemiş ise yada viskosite fazla ise kaydedilmelidir. Bu olayda prostat salgısı etkindir (Lilja ve Laurell, 2009). Sperm hareketini ve konsantrasyonunu etkilemektedir (Amelar, 1962).

Hacim: Semen volümü 1,5 ml'nin üzerinde olmalıdır.

pH: Ejakulatın normal olarak kabul edilen pH değeri 7,2 ile 8,0 arasında olmalıdır.

2.9.4 Mikroskopik değerlendirme

Mikroskopik değerlendirmede sperm dışı hücre, hareket, morfoloji ve konsantrasyon incelenir.

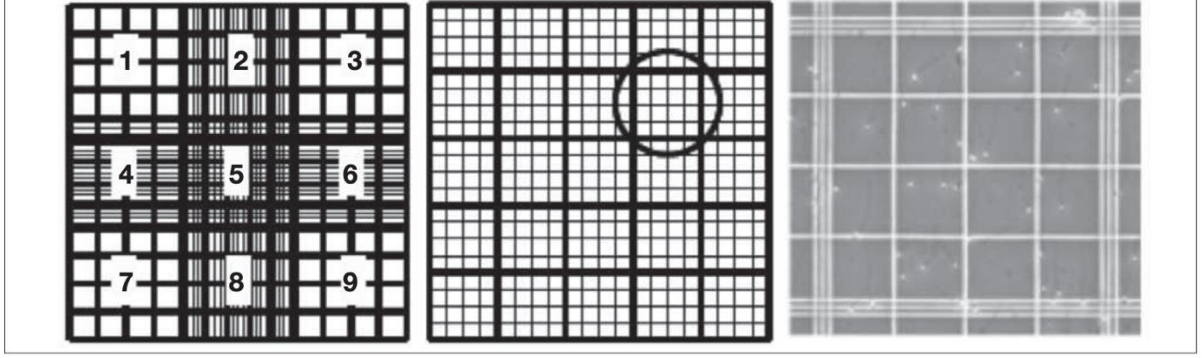
Sperm dışı hücreler: Ejakulat içerisinde spermatozoon hücrelerinin dışında ürogenital sisteme ait prostata ait hücreler, spermatogenetik seriye ait hücreler, epitel hücreler ve lökositler olmak üzere yuvarlak hücreler olarak adlandırılan değişik hücreler de görülebildiği bildirilmiştir. DSÖ sperm dışı hücreler için üst limit olarak 5 milyon/ml olarak belirlemiştir. Lökositler; semende sık rastlanmakla birlikte çoğunlukla nötrofil olmak üzere 1 milyon/ ml'nin üzerinde olması durumunda (lökositospermi) enfeksiyon ve sperm kalitesinde bozukluklara neden olduğu belirtilmiştir (Lackner vd., 2010).

Konsantrasyon: Sperm sayısının alt limiti fertilizasyon için 15 milyon/mL'dir (Wang ve Swerdloff, 2014).

Motilite (Sperm Hareketliliği): Spermiler DSÖ'nün verilerine göre hareketlilikleri 4 gruba ayrılır:

- a) İleri (progressif) hareketlilik: Sperm hücresi doğrusal ya da geniş dairesel hareket ile ilerleyici olarak hareket eder.
- b) İleri olmayan (Nonprogresif) hareketlilik: İleriye doğru olmayan hareketlerin tümünü içerir.
- c) Yerinde hareketlilik: Sperm hücrelerinin yerinde hareket etmesi durumudur.
- ç) Hareketsiz spermiler: Hiç hareketin olmaması durumudur.

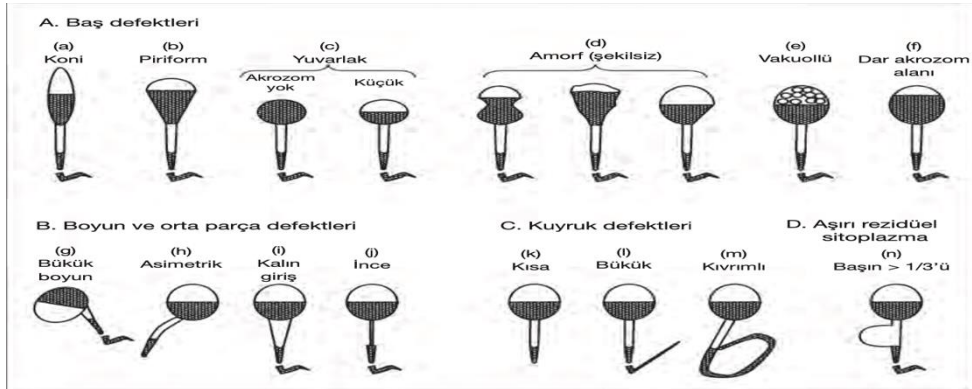
Morfoloji: Baş, boyun ve kuyruğa göre morfoloji anormallikleri sınıflandırılır. Normal formlu sperm hücreleri için en düşük referans değer %4'tür.



Şekil 2.14: Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi

Bir spermatozoonun normal kabul edilebilmesi için sperm başı, boynu, orta kısmı ve kuyruğu normal olmalıdır.

- Baş defektleri: Küçük, artmutlaşmış, yuvarlak, geniş, şekilsiz başlar, yassı, vakuollü başlar, küçük akrozomal bölge içeren başlar ve çift başlılar veya bunları içeren herhangi bir kombinasyonu olma durumudur.
- Boyun defektleri: Orta kısmın başa asimetric girişi, bükük boyun, kalın veya şekilsiz orta kısım, anormal derecede ince orta kısım; veya bunları içeren herhangi bir kombinasyonu olma durumudur.
- Kuyruk defektleri: Kısa, birden fazla, u-şeklinde bükülmüş, kırık veya bükük kuyruklar ($>90^\circ$), düzensiz aralıkta kuyruklar, halkalı kuyruklar veya bunları içeren herhangi bir kombinasyonu olma durumudur.



Şekil 2.15: İnsan spermatozoasının bazı anormal formlarının şematik resmi (Kruger vd., 1993)

2.10 Sperm Hazırlama (Yıkama) Yöntemleri

Spermatozoonun oositi döllemeye hazır hale gelmesi kapasitasyon olarak adlandırılır. Ejaküle edilmiş semen visköz bir sıvı olup sperm içeren testiküler ve epididimal sekresyonların, ejakulasyon sırasında prostattan salınan sekresyonları ile karışımından oluşmaktadır.

Spermin hazırlanma amacı hareketli spermlerin konsantre edilerek seminal plazma ve çökeltiden uzaklaştırılmasıdır. İn vivo durumda servikal mukus, sperm hücrelerinin çevresini oluşturan ve kapasitasyonu engelleyen seminal plazmadan kaçmasını sağlayarak kapasitasyon başarısını artırır. IVF işlemlerinde *in vitro* şartlarda kapasitasyonu gerçekleştirmek amacıyla sperm hücrelerini kapasitasyonu engelleyen hücreler ve bakterilerden uzaklaştırmak gerekir. Semen yıkama prosedürleri sperm hücrelerini seminal plazmadan ayırmak amacıyla yapılmaktadır. İleri hareketli, morfolojisi düzgün spermleri ve DNA hasarı olmayan spermleri seçmek amacıyla sperm hazırlama yöntemleri kullanılır.

Tüp bebek uygulamaları ilerledikçe sperm hazırlama tekniklerinin de geliştiği ifade edilmiştir. En yaygın olarak kullanılan yöntemler, swim-up (yüzdürme) ve yoğunluk gradient yöntemleridir.

Tablo 2.2: Tüp Bebek uygulamalarında alternatif sperm yıkama yöntemleri

Swim-up
Mikro-akışkan çipler
Yoğunluk Gradient Yöntemi
Zeta Yöntemi
Glass-Wool Kolon Filtrasyonu
MACS Yöntemi
Elektroforez

Sperm hazırlama yöntem yada yöntemlerinin hareketli sperm sayısına, hareketli : hareketsiz sperm sayısının oranına, volümüne, antikor, aglütinasyon ve sperm dışı hücrelerin olma durumuna bağlı olarak seçilir.

2.10.1 Swim-up yöntemi

Motil spermlerin immotil spermlerden ayırılabilmesi için geliştirilen bir yöntemdir.

2.10.2 Yoğunluk yöntemi (Gradient yöntemi)

Yoğunluklarına göre spermatozoon hücrelerini ayıran yöntemdir. Her bir spermatozoon santrifüjlemenin ardında, yoğunluğuyla aynı durumdaki gradyan seviyesinde bulunur.

2.10.3 Mikro akışkan teknolojiler ve mikro akışkanlarla sperm hazırlanması

Pasif mikro akışkan teknolojide sadece spermatozoonların kendi hareketliliğinin kullanıldığı belirtilmiştir. En hareketli spermatozoonları santrifüj olmadan mikro akışkan kanalların çıkışından optimum bir sürede toplarken, daha az hareketli ve hareketsiz spermatozoonları mikrokanallarda geride kalması pasif mikro-akışkan teknolojinin amacıdır.



Şekil 2.16: Mikro akışkan çip yöntemine göre spermilerin hazırlanması

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Çalışma Protokolü

Bu çalışmada, açıklanamayan infertilite durumundaki ve tekrarlayan başarısız tüp bebek denemeleri olan; sonucunda infertil tanısı konan Acıbadem Fulya Hastanesi tüp bebek bölümü yardımcı üreme tekniklerine başvurmuş erkek hastalardan semen analizinde swim-up ve mikro-akışkan çip kullanmış hastaların laboratuvar sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir.

3.2 Hasta Seçimi

Hasta veri tabanı oluşturmak amacıyla Mart 2015 - Aralık 2020 tarihleri arasında Acıbadem Fulya Hastanesi tüp bebek bölümü yardımcı üreme tekniklerine başvurmuş olan ve erkek hastaların semen analizinde swim-up ve mikro akışkan çip kullanılmış 120 hastanın kayıtları incelenmiştir. Bunlar içerisinde birden fazla kaydı olanlar, spermi farklı bir yöntemle elde edilen hastalar dışlanmıştır. Erkek hastalardan alınan semen örneklerine uygulanan sperm hazırlama yöntemlerinin (swim-up ve mikro-akışkan çip) embriyo kalitesi ve gebeliğe etkilerini değerlendirmek amaçlanmıştır.

3.3 Bakılan Parametreler

Hasta bilgileri; hastaların dosyaları Acıbadem Fulya Hastanesi tüp bebek bölümü yardımcı üreme tekniklerine başvurmuş olan hastaların veri tabanı kullanılarak oluşturuldu. Hastaların mevcut hastalıkları, kullandıkları ilaçlar, sigara ve alkol içip içmediklerini içeren tıbbi öyküleri değerlendirildi.

3.3.1. Hasta seçim kriterleri

- Mikro-akışkan çip yöntemi 5×10^6 ml'den fazla sayıdaki sperm örnekleri ile çalışıldığından, sperm konsantrasyonu 5×10^6 ml'den fazla olan hastalar çalışmaya dahil edildi.
- Kadın hastaların yaşları 35 yaş altı ve 35 yaş üstü olarak çalışmaya dahil edildi.
- 2'den fazla tüp bebek (mikroenjeksiyon) denemesi yapılan hastalar çalışmaya dahil edildi.

3.4 Etik Kurul İzni

“Tüp bebek tedavisinde mikro akışkan çip (Sperm Chip) ve yüzdürme (swim-up) yıkama yöntemlerinin embriyo gelişimine ve gebeliğe etkisi” başlıklı çalışmamız için İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fen, Sosyal ve Girişimsel Olmayan Etik Kurul Başkanlığına yapılan başvurumuz, etik ve bilimsel açıdan incelenerek uygun bulunmuştur.

3.5 İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 23 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi, Q-Q grafikler ve histogramlar ile değerlendirildi. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma, medyan) yanı sıra normal dağılım göstermeyen niceliksel verilerin iki grup arası değerlendirmelerinde Mann Whitney U testi kullanıldı. Niceliksel verilerin ikiden grup fazla grup arası değerlendirmelerinde Kruskal Wallis testi, farklılığa neden olan grubun tespitinde ise Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin değerlendirilmesinde Pearson Ki-Kare testi kullanıldı. Korelasyon analizi için Spearman Rho Korelasyon Katsayısı kullanıldı. Anlamlılık $P < 0,05$ ve $P < 0,01$ düzeylerinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışması, yaşları 20 ile 45 arasında değişmekte olan 120 çift ile yapılmıştır. Tüp bebek tedavisi için grupların yarısına “Mikro akışkan çip”, diğer yarısına ise “Swim-up” yöntemi uygulanmıştır ve bu yöntemlerin embriyo kalitesi ile gebelik üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Kadınların %50’si 35 yaşın altında, geri kalanı ise 35 yaş ve üzerindedir.

Mikro akışkan çip ve swim-up gruplarında kadınların yaş ortalamaları ve toplanan oosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Sperm konsantrasyonunun, swim-up grubunda mikro akışkan çip grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P=0,006$; $P<0,01$). Sperm sayıları kategorize edildiğinde (>40 , $15-40$, <15); mikro akışkan çip ve swim-up grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($P<0,001$; $P<0,01$). Mikro akışkan çip grubunda sperm sayısının 15 milyonun altında görülme oranı (%87), swim-up grubuna (%13) göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür. Mikro akışkan çip ve swim-up grupları arasında sperm hareketliliği ve sperm progresif hareketliliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Transfer edilen embriyo kaliteleri açısından kıyaslandığında mikro akışkan çip ve swim-up grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$). Mikro akışkan çip ve swim-up grupları arasında gebelik görülme oranları açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$) (**Tablo 4.1**).

A, B ve C embriyo kalitesine göre mikro akışkan çip ve swim-up grupları arasında kadınların yaşları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$) (**Tablo 4.2**). Mikro akışkan çip ve swim-up grupları kendi içinde değerlendirildiğinde ise her iki grup için de yaş grupları ile embriyo kalitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Sırasıyla; **Tablo 4.3 ve Tablo 4.4**).

Tablo 4. 1: Hastalara ilişkin genel özelliklerin, embriyo kalitelerinin ve gebelik oranlarının değerlendirilmesi

Genel ve Embriyolojik Özellikler	Mikro akışkan çip (n=60)	Swim-up (n=60)	Test Değeri	P Değeri
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)		
Kadın yaşı (yıl)	33,77±4,59 (33,5)	34,87±5,11 (35,5)	t=-1,241	0,217
Oosit sayısı	11,63±5,43 (11)	12,00±5,42 (12)	Z=-0,338	p=0,735
Sperm konsantrasyonu (x10 ⁶ /ml)	38,47±34,60 (28)	49,40±26,46 (45)	Z=-2,727	p=0,006**
Sperm konsantrasyonu grup (x10 ⁶ /ml)				
>40	22 (%38,6)	35 (61,4)		
15-40	18 (45)	22 (55)	χ ² =15,930	p<0,001**
<15	20 (%87)	3 (%13)		
Sperm hareketliliği (%)	59,98±14,49 (63)	60,44±13,24 (62)	Z=-0,047	p=0,963
Sperm progresif hareketlilik (%)	32,41±13,75 (33)	36,10±13,77 (35)	Z=-1,183	p=0,237
Embriyo kalitesi				
A	39 (%54,2)	33 (%45,8)		
B	14 (%43,8)	18 (%56,3)	χ ² =1,250	p=0,535
C	7 (%43,8)	9 (%56,3)		
Gebelik				
Var	33 (%50)	33 (%50)	χ ² =0,001	p=1,000
Yok	27 (%50)	27 (%50)		

t= Student-t Testi Z=Mann Whitney U Testi χ²=Pearson Ki-Kare Testi
p<0,01**

Tablo 4. 2: Gruplardaki kadın yaşlarının embriyo kalitesine göre değerlendirilmesi

Kadın Yaşı (yıl)	Mikro akışkan çip (n=60)	Swim-up (n=60)	Test Değeri	P Değeri
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)		
Embriyo kalitesi				
A	34,08±4,69 (34)	34,42±4,51 (35)	Z=-0,199	p=0,843
B	32,39±3,94 (33)	34,94±6,48 (35,5)	Z=0,083	p=0,084
C	35,00±5,16 (35)	36,33±4,33 (37)	Z=-0,583	p=0,560

Z=Mann Whitney U Testi χ²: Kruskal Wallis Testi

Tablo 4. 3: Mikro akışkan çip grubunda kadınların yaş grupları ile embriyo kalitesi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Mikro akışkan çip	Yaş Grubu		Test Değeri	P Değeri
	35 yaş altı (n=35)	35 yaş ve üzeri (n=25)		
Embriyo kalitesi	n (%)	n (%)		
A	21 (%60)	18 (%72)		
B	11 (%31,4)	3 (%12)	$\chi^2=3,372$	p=0,185
C	3 (%8,6)	4 (%16)		

χ^2 : Pearson Ki-Kare Testi

Tablo 4. 4: Swim-up grubunda kadınların yaş grupları ile embriyo kalitesi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Swim-up	Yaş Grubu		Test Değeri	P Değeri
	35 yaş altı (n=35)	35 yaş ve üzeri (n=25)		
Embriyo kalitesi	n (%)	n (%)		
A	16 (%64)	17 (%48,6)		
B	6 (%24)	12 (%34,3)	$\chi^2=1,403$	p=0,496
C	3 (%12)	6 (%17,1)		

χ^2 : Pearson Ki-Kare Testi

Gebeliğin görüldüğü kadınların yaşları değerlendirildiğinde swim-up grubundaki kadınların yaş ortalaması, mikro akışkan çip grubundakilerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($P=0,011$; $P<0,05$). Ancak gebeliğin görülmediği kadınların yaşları için her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P=0,842$, $P<0,05$) (Tablo 4.5).

Mikro akışkan çip grubunda yaş grupları ile gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ($P=0,002$; $P<0,01$). Mikro akışkan çip grubunda yer alan 35 yaş altındaki kadınlarda gebelik görülme oranının (%71,4), 35 yaş ve üzeri olan kadınlara (%32) göre anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4.6). Swim-up grubunda yaş grupları ile gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ($P>0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4. 5: Gruplardaki kadın yaşlarının gebelik durumuna göre değerlendirilmesi

Kadın Yaşı (yıl)	Mikro akışkan çip	Swim-up	Test Değeri	P Değeri
	(n=60)	(n=60)		
Gebelik	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)		
Var	32,58±3,55 (33)	34,88±4,65 (36)	Z=-2,599	p=0,011*
Yok	35,22±5,30 (36)	34,85±5,72 (35)	Z=-0,199	p=0,842

Z=Mann Whitney U Testi *p<0,05

Tablo 4. 6: Mikro akışkan çip grubunda kadınların yaş grupları ile gebelik oranları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Mikro akışkan çip	Yaş Grubu		Test Değeri	P Değeri
	35 yaş altı (n=35)	35 yaş ve üzeri (n=25)		
Gebelik	n (%)	n (%)		
Var	25 (%71,4)	8 (%32)	$\chi^2=9,160$	p=0,002**
Yok	10 (%28,6)	17 (%68)		

χ^2 : Pearson Ki-Kare Testi **p<0,01

Tablo 4. 7: Swim-up grubunda kadınların yaş grupları ile gebelik oranları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Swim-up	Yaş Grubu		Test Değeri	P Değeri
	35 yaş altı (n=35)	35 yaş ve üzeri (n=25)		
Gebelik	n (%)	n (%)		
Var	13 (%52)	20 (%57,1)	$\chi^2=0,156$	p=0,693
Yok	12 (%48)	15 (%42,9)		

χ^2 : Pearson Ki-Kare Testi

Mikro akışkan çip ve swim-up grupları kendi içinde değerlendirildiğinde ise her iki grup için de embriyo kalitesi ile gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($P>0,05$) (Tablo 4.8 ve Tablo 4.9).

Tablo 4. 8: Mikro akışkan çip grubunda embriyo kalitesi ile gebelik oranı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Mikro akışkan çip	Gebelik Oranı		Test Değeri	P Değeri
	Var (n=33)	Yok (n=27)		
Embriyo kalitesi	n (%)	n (%)		
A	22 (%36,7)	17 (%28,3)		
B	8 (%13,3)	6 (%10)	$\chi^2=0,474$	p=0,789
C	3 (%5)	4 (%6,7)		

χ^2 : Pearson Ki-Kare Testi

Tablo 4. 9: Swim-up grubunda embriyo kalitesi ile gebelik oranı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Swim-up	Gebelik Oranı		Test Değeri	P Değeri
	Var (n=33)	Yok (n=27)		
Embriyo kalitesi	n (%)	n (%)		
A	19 (%31,7)	14 (%23,3)		
B	8 (%13,3)	10 (%16,7)	$\chi^2=1,394$	p=0,498
C	6 (%10)	3 (%5)		

χ^2 : Pearson Ki-Kare Testi

Embriyo kalite durumları, iyi kalitedeki embriyo (A) ve diğer embriyolar (B ve C) olmak üzere iki gruba ayrılarak gebelik görülme durumları ile kıyaslanmıştır. A kalitedeki embriyoların olduğu grupta, gebelik oranları açısından mikro akışkan çip ile swim-up yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Ayrıca B ve C kalitedeki embriyoların olduğu grupta da gebelik oranları açısından her iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Tablo 4.10).

Tablo 4. 10: Embriyo kalite gruplarının gebelik oranları açısından mikro akışkan çip ve swim-up yöntemleri arasında karşılaştırılması

Embriyo Kalitesi	Gebelik	Mikro akışkan çip (n=60)	Swim-up (n=60)	Test Değeri	P Değeri
		n (%)	n (%)		
A	Var	22 (%56,4)	19 (%57,6)	$\chi^2=0,010$	p=0,921
	Yok	17 (%43,6)	14 (%42,4)		
B ve C	Var	11 (%52,4)	14 (%51,9)	$\chi^2=0,001$	p=1,000
	Yok	10 (%47,6)	13 (%48,1)		

χ^2 : Pearson Ki-Kare Testi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

In vitro fertilizasyon (IVF) gibi yardımcı üreme tekniklerinin kullanıldığı tüp bebek tedavilerinde kaliteli dişi ve erkek üreme hücrelerinin seçimi, kaliteli embriyo oluşturulabilmesi açısından oldukça önemlidir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tekniği, yaklaşık olarak %30 oranında yalnızca erkek infertilitesinin gözlemlendiği vakalarda sıklıkla kullanılan bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkar ve bu durumda doğru kalitedeki spermatozoonu seçimi kritiktir (Cardona vd., 2020).

Hareketliliğin yüksek olduğu normal morfolojiye sahip spermatozoonları seçmek için günümüzde swim-up ve yoğunluk gradient gibi sperm yıkama teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır ancak bu tekniklerde numunelerin santrifüj edilmesinin, spermatozoonlarda DNA hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (Alvarez vd., 1993; Shiota vd., 2016). Santrifüjle birlikte ortaya çıkan reaktif oksijen türevlerinin artışı, embriyo kalitesini yüksek oranda etkilemekte ve denemelerin başarısızlıkla sonuçlanmasına sebep olmaktadır (Colaco ve Sakkas, 2018; Piccolomini vd., 2018). Bu nedenle mikro akışkan çip tekniği geliştirilerek spermatozoonlarda santrifüj kaynaklı DNA hasarının önlenmesi hedeflenmiş ve bu açıdan başarılı sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir (Anbari vd., 2021; Parrella vd., 2019). Bu tez çalışmasında sıklıkla kullanılan geleneksel swim-up sperm yıkama metodu ile yeni bir yöntem olan mikro akışkan çip metodu arasındaki farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Ancak literatürde mikro akışkan çiplerin swim-up yöntemi ile karşılaştırıldığı çalışmalar yeterli sayıda olmadığından bu bölümde yer yer yoğunluk gradient yönteminin kullanıldığı çalışmalar da değerlendirilmiştir.

Çalışmaya kadın yaşları 20 ile 45 arasında değişen 120 çift dahil edilmiştir ve kadınların yarısı 35 yaşın altında, diğer yarısı 35 yaş ve üzerindedir. Bu çalışma, mikro akışkan çip ve swim-up yöntemlerini karşılaştırarak kadın yaşı ile embriyo kalitesi, kadın yaşı ile gebelik oranı ve embriyo kalitesi ile gebelik oranı açısından literatüre yeni veriler kazandırmakta; kıyaslanan diğer değişkenler için de literatüre güncel veriler sunmaktadır.

Mikro akışkan çip ile swim-up gruplarındaki kadınların yaş ortalamaları ve toplanan oosit sayıları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ve bu açıdan grupların homojen dağıldığı gösterilmiştir.

Swim-up ve yoğunluk gradient gibi geleneksel yöntemlere kıyasla mikro akışkan çiplerin kullanıldığı çalışmalarda sperm konsantrasyonunun bazı çalışmalarda farklılık oluşturmadığı (Ozcan vd., 2021; Yetkinel vd., 2019; Yildiz ve Yuksel, 2019) ancak bazı çalışmalarda da sperm konsantrasyonunun çip kullanılan grupta anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (Anbari vd., 2021; Guler vd., 2021; Quinn vd., 2018). Bu çalışmada swim-up ile mikro akışkan çip grupları kıyaslandığında sperm sayısının, swim-up grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre swim-up yönteminin kullanımı, daha fazla spermatozoon elde edilmesi açısından daha avantajlı görünmektedir.

Geleneksel yöntemler ile mikro akışkan çiplerin sperm hareketliliği açısından kıyaslandığı çalışmalarda bazıları iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiş (Yetkinel vd., 2019; Yildiz ve Yuksel, 2019), bazı çalışmalar ise mikro akışkan çip yönteminde sperm hareketliliğinin anlamlı düzeyde arttığını bildirmiştir (Chinnasamy vd., 2016; Gode vd., 2019; Parrella vd., 2019; Zhang vd., 2015). Bazı çalışmalarda da swim-up ile yoğunluk gradient yöntemleri kıyaslanmış ve swim-up yönteminde sperm hareketliliğinin anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Göde vd., 2020; Jon Romero vd., 2021). Bununla birlikte sperm progresif hareketliliğin değerlendirildiği çalışmalarda mikro akışkan çip metodunun geleneksel metodlara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterilmiş (Anbari vd., 2021; Guler vd., 2021; Parrella vd., 2019; Quinn vd., 2018) ancak bir çalışmada da anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (Göde vd., 2020). Çalışmamızda hem hareketlilik hem de progresif hareketlilik açısından mikro akışkan çip ve swim-up grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Bulgularımıza göre mikro akışkan çipler daha hareketli spermatozoon elde etmek açısından bir farklılık oluşturmamıştır.

Embriyoların kalitesini araştıran çalışmaları incelendiğinde bazı çalışmalar swim-up grubuna kıyasla mikro akışkan çip grubunda yüksek kalitedeki embriyo oranının anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu bildirmiş (Anbari vd., 2021; Yetkinel vd., 2019) ancak bir çalışmada da anlamlı bir farklılık olmadığı gösterilmiştir (Yalcinkaya Kalyan vd., 2019). Bununla birlikte yoğunluk gradient yöntemi ile mikro akışkan çip yöntemini kıyaslayan çalışmalarda ise çip kullanılan gruplarda daha yüksek oranda iyi

kalitede embriyo geliştiği bildirilmiştir (Guler vd., 2021; Keskin vd., 2021; Pabuccu vd., 2018). Bu tez çalışmasında ise embriyo kaliteleri açısından kıyasladığımızda her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Bulgularımıza göre mikro akışkan çiplerin, daha kaliteli embriyo elde etmek açısından bir yarar sağlamadığı ortaya çıkmıştır.

Gebelik oranlarını kıyaslayan çalışmalar incelendiğinde, bir çalışma swim-up grubuna kıyasla mikro akışkan çip grubundan elde edilen gebelik oranının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirirken (Anbari vd., 2021) bazı çalışmalar ise iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığını bildirmiştir (Leisinger vd., 2021; Yalcinkaya Kalyan vd., 2019). Yoğunluk gradient ve mikro akışkan çip yöntemlerini kıyaslayan çalışmalar incelendiğinde de bazı çalışmalar iki grup arasında anlamlı bir farklılık gözlemediğini bildirirken (Gode vd., 2019; Keskin vd., 2021; Parrella vd., 2019; Yıldız ve Yuksel, 2019) bir çalışma da gebelik oranının çip grubunda anlamlı düzeyde artış gösterdiğini bildirmiştir (Ozcan vd., 2021). Çalışmamızda ise her iki grup arasında gebelik görülme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Bu anlamda çalışmamıza göre mikro akışkan çip kullanımının, gebelik oranını arttırmak açısından bir avantaj sağlamadığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda kadın yaşı ile A, B ve C kalitesindeki embriyolar arasındaki ilişki her iki grup açısından bir farklılık tespit edilmemiştir. Bunun yanı sıra mikro akışkan çip ve swim-up grupları kendi içinde değerlendirildiğinde de kadın yaşının embriyo kalitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Çalışmamıza göre kadın yaşı, embriyo kalitesi üzerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Embriyo kalitesi ile kadın yaşı arasındaki ilişkiyi mikro akışkan çip ve geleneksel yıkama yöntemlerini temel alarak kıyaslayan bir çalışma bildiğimiz kadarı ile yoktur. Bu anlamda çalışmamız literatüre yeni bir veri sunmuştur.

Bir çalışmada kadın yaşının gebelik oranları üzerine olan etkisi mikro akışkan çip ve yoğunluk gradient yöntemleri için araştırılmış ve her iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (Ozcan vd., 2021). Bununla birlikte bu iki değişkeni swim-up ile mikro akışkan çip yöntemleri için kıyaslamış bir çalışmada bildiğimiz kadarı ile yoktur. Çalışmamızda swim-up ile mikro akışkan çip yöntemlerini kıyasladığımızda swim-up grubundaki gebelik görülen kadınların yaş ortalamasının, mikro akışkan çip grubundaki yaş ortalamalarına göre anlamlı düzeyde

daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak gebeliğin görülmediği grupları kıyaslandığında her iki grup arasında kadın yaşları açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Sonuçta swim-up yönteminin ilerleyen kadın yaşı için gebelik görülme oranını arttırdığını, mikro akışkan çiplerin ise bu konuda anlamlı bir etki oluşturmadığını söyleyebiliriz.

Mikro akışkan çip ve swim-up grupları, kendi içerisinde 35 yaş altı ile 35 yaş ve üstü olmak üzere iki grup halinde yaştan gebelik üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlarımıza göre mikro akışkan çip yönteminde 35 yaş altındaki gruptaki gebelik görülme oranı, 35 yaş ve üzerindeki göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Swim-up yönteminde ise her iki yaş grubu için kadın yaşının gebelik görülme oranı üzerine anlamlı bir etkisi bulunamamıştır. Bulgularımıza göre mikro akışkan çip yöntemi 35 yaş altındaki kadınlarda gebelik görülme oranını arttırmakta, 35 yaş ve üzeri için anlamlı bir etki oluşturmamaktadır. Swim-up yöntemi ise her iki yaş kategorisi için de birbiri arasında anlamlı bir etki oluşturmayacak düzeyde etkili olmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçları kıyaslayabileceğimiz bir çalışmaya rastlamadık, bu anlamda çalışmamız literatüre yeni veriler sunmuştur.

Çalışmamızda embriyo kalitesi ile gebelik oranları arasındaki ilişkiyi mikro akışkan çip ve swim-up yöntemleri için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre hem mikro akışkan çip yöntemi için hem de swim-up yöntemi için embriyo kalitesi ile gebelik oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda mikro akışkan çip ve swim-up gruplarındaki embriyo kalite durumları, iyi kalitedeki embriyo (A) ve diğer embriyolar (B ve C) olmak üzere iki gruba ayrılarak gebelik oranları açısından değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre mikro akışkan çip ve swim-up yöntemlerinin kullanılarak elde edilen ve iyi kalite olarak tanımlanan A kalitedeki embriyoların transfer edilmesi, gebelik oranlarını arttırmak açısından anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Ayrıca diğer embriyolar olarak tanımlanan B ve C kalitedeki embriyoların transfer edilmesi de gebelik oranları açısından her iki yöntem kıyaslandığında anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Sonuç olarak farklı yöntemlerle elde edilen spermiler ile iyi veya diğer kalitedeki embriyoların transfer edilmesi, gebelik oranı açısından anlamlı bir farklılık oluşturmamaktadır.

Bulgularımızı kıyaslayabileceğimiz bir çalışma ile karşılaşmadığımız için bu noktada da literatüre yeni bir veri sunmaktayız. Ancak karşılaştığımız bu verilerin, gebelik oranı açısından kadınlardaki hormon düzeyleri ve endometriyal durumlar gibi farklı değişkenler açısından da değerlendirilmesi ve literatürdeki bu açıklığın doldurulması gerektiğini söyleyebiliriz.

5.1 Sonuç

Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda literatürün sunduğu bazı verilerin de paralelinde mikro akışkan çip metodu, swim-up yöntemine göre bir üstünlük sağlamamıştır. Beraberinde swim-up yöntemi, mikro akışkan çip yöntemine göre ileri yaş grubundaki kadınlar için gebelik oranı açısından daha yararlı bir yöntem gibi gözükmektedir. Mikro akışkan çip yönteminin ise 35 yaşın altındaki kadınlar için gebelik oranı açısından daha yararlı olduğunu söyleyebiliriz. Embriyo kalitesi açısından karşılaştığımızda da her iki yöntem arasında gebelik oranları açısından bir farklılık gözlemedik. Bu nedenle elde ettiğimiz sonuçlara göre mikro akışkan çiplerin kullanımı, maliyet açısından da düşünüldüğünde tekrardan değerlendirilmesi gereken bir konudur. Santrifüj kullanımını gerektiren geleneksel yöntemlerin, her ne kadar DNA fragmantasyonu ve akabinde reaktif oksijen türevlerinin artışını indüklediği gösterilmiş olsa da oluşan hasarın düzeyi blastokist ve embriyo kalitesi, beraberinde gebelik oranları ve canlı doğum oranları açısından daha detaylı incelenmelidir. Belki de embriyonun plastisitesi açısından bakıldığında oluşan hasar embriyo tarafından bertaraf edilmektedir. Tüm bu sorulara yanıt bulabilmek için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu bildirmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

Açıköz, Y. (2019). İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu tedavisine başlanan çiftlerde embriyo transferi öncesi siklus iptal nedenleri

Akçaoğlu, G. (2018). İnfertil çiftlerde erkek faktörünün embriyo kalitesi ve implantasyon üzerine etkisinin retrospektif araştırılması

Alvarez, J. G., Lasso, J. L., Blasco, L. (1993). Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Human Reproduction*, 8(7):1087-1092

Amelar, R. D. (1962). Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *The Journal of Urology*, 87(2), 187–190. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)64936-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)64936-X)

Anbari, F., Khalili, M. A., Sultan, Ahamed A. M. (2021). Microfluidic sperm selection yields higher sperm quality compared to conventional method in ICSI program. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 67(2):137-143. <https://doi:10.1080/19396368.2020.1837994>

Aslan, E. (2019). Sperm hazırlama yöntemlerinin sperm kromatin kondensasyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi

Asyalı, A., Menevşe, S. (2010). İvf Tedavisi Sonrası İmplantasyon Başarısızlığı Olan Olgularda Endometrial Igf2 Ve H19 Gen Ekspresyonlarının Fertil Grupla Karşılaştırılması

Aydın Deniz, Ş. (2017). Erkek infertilitesi nedeniyle yapılan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sikluslarında mikroakışkan çip ile seçilen spermelerin klinik sonuçlara etkisi var mı?

Cardona, Barberán A., Boel, A., Vanden Meerschaut, F., Stoop, D., Heindryckx, B. (2020). Diagnosis and Treatment of Male Infertility-Related Fertilization Failure. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 3899. doi:https://doi.org/10.3390/jcm9123899

Chinnasamy, T., Behr, B., Demirci, U. (2016). Microfluidic sperm sorting device for selection of functional human sperm for IUI application. *Fertility and Sterility*, 105(2), 17-18. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.12.063

Colaco, S., Sakkas, D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(11). 1953-1968. doi:10.1007/s10815-018-1304-4

Çelikkalkan, Şençoban., Gaye, Arzu. (2018). Gebe sıçan ovaryumunda damar gelişiminin histolojik incelemesi

Delilbaşı, L. (2007). *In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*, 117–118

Delilbaşı, L. (2008). *In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*.

Dinçel, S. (2019). Tüp bebek laboratuvar uygulamalarında sperm hazırlama yöntemlerinin IVF başarısı üzerine etkileri

Elder, K., Dale, B. (2013). *In-Vitro Fertilizasyon*

Elder, K., Dale, B. (2014a). *In-Vitro Fertilizasyon* (3) 164

Elder, K., Dale, B. (2014b). *In-Vitro Fertilizasyon* (3) 170

Elder, K., Dale, B. (2014c). *In-Vitro Fertilizasyon* (3) 176-177

Ercan, Ü. G. (2015). Açıklanamayan infertilite hasta grubunda yaşanan IVF uygulama başarısızlıklarında sperm DNA hasarı ve anöploidinin etkisi

Glujovsky, D., & Farquhar, C. (2016). Cleavage-stage or blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 106(2), 244-250. <https://doi.org/10.1016/J.Fertnstert.2016.06.029>

Gode, F., Bodur, T., Gunturkun, F. (2019). Comparison of microfluid sperm sorting chip and density gradient methods for use in intrauterine insemination cycles. *Fertility and Sterility*, 112(5), 842-848. <https://doi:10.1016/j.fertnstert.2019.06.037>

Gorur, S. (2019). *Ürogenital enfeksiyonlar ve erkek infertilitesi*

Göde, F., Sami, Gürbüz A., Tamer, B., Pala, İ., Isik, A. Z. (2020). The Effects of Microfluidic Sperm Sorting, Density Gradient and Swim-up Methods on Semen Oxidation Reduction Potential. *Urology Journal*, 17(4), 397-401. <https://doi.org/10.22037/uj.v0i0.5639>

Gökçimen, A., Temel, S. (2009). Implantasyon ve moleküler etkileşimler. *SDU Medical Faculty Journal*, 11(4). <https://doi.org/10.17343/SDUTFD.26427>

Grudzinskas, J., Grudzinskas, G. J., Yovich, J. L. (2022). *Gametes - The Spermatozoon*

Guler, C., Melil, S., Ozekici, U., Donmez Cakil, Y., Selam, B., Cincik, M. (2021). Sperm Selection and Embryo Development: A Comparison of the Density Gradient Centrifugation and Microfluidic Chip Sperm Preparation Methods in Patients with Astheno-Teratozoospermia. *Life*, 11(933), 1-9

Işık, A. Z., Vicdan, K. (1999a). *In Vitro Fertilizasyon Ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar*, 130

Işık, A. Z., Vicdan, K. (1999b). *In Vitro Fertilizasyon Ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar*, 133

Jon, Romero-Aguirregomez-corta., Laguna-Barraza, R., Fernández-González, R. (2021). Sperm selection by rheotaxis improves sperm quality and early embryo development. *Reproduction*, 161(3), 343-352

Karagöz Can, N. (2020). Erkek üreme sistemi ve otofaji. *Dergi Park*

Keskin, M., Pabuçcu, E. G., Tufan, A., Demirkıran, D. Ö., Pabuçcu, R. (2021). Does microfluidic sperm sorting (MSS) affect embryo euploidy rates in couples with high sperm DNA fragmentation (SDF)? *Human Reproduction*, 36(1).
<https://doi.org/10.1093/humrep/deab130.065>

Kumar, N., Singh, A. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191.
<https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>

Kwang, W. Jeon. (2004). International Review of Cytology. *A Survey of Cell Biology*

Lackner, J. E., Agarwal, A., Mahfouz, R., Du, Plessis., S. S., Schatzl, G. (2010). The association between leukocytes and sperm quality is concentration dependent. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-12>

Leisinger, CA., Adaniya, G., Freeman, MR. (2021). Effect of Microfluidic Sperm Separation vs. Standard Sperm Washing Processes on Laboratory Outcomes and Clinical Pregnancy Rates in an Unselected Patient Population. *Reproductive Medicine*, 2(3), 125-130. <https://doi.org/10.3390/reprodmed2030013>

Lilja, H., Laurell, C. B. (2009). Liquefaction of coagulated human semen. 44(5), 447–452. <https://doi.org/10.3109/00365518409083836>

Miettinen, M., Virtanen, I., Talerman, A. (1985). Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *The American Journal of Pathology*, 120(3), 402.

Milardi, D., Grande, G., Sacchini, D., Astorri, A. L., Pompa, G., Giampietro, A., De Marinis, L., Pontecorvi, A., Spagnolo, A. G., Marana, R. (2012). Male fertility and reduction in semen parameters. *International Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1155/2012/649149>

O'Flynn, O'Brien., K. L., Varghese, A. C., Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 93(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.045>

Ozcan, P., Takmaz, T., Kocer Yazici, MG. (2021). Does the use of microfluidic sperm sorting for the sperm selection improve in vitro fertilization success rates in male factor infertility? *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 47(1), 382-388. <https://doi:10.1111/jog.14539>

Öner, Z. (2020). Farklı semen konsantrasyonlarında yapılan sperm kriyoprezervasyonunun sperm canlılığı ve DNA fragmentasyonuna etkisi

Pabuccu, E., Pabuccu, R., Sertyel, S. (2018). Impact of Microfluidic Sperm Sorting on Embryo Quality and Comprehensive Chromosome Screening Outcomes of Couples with Repeated Implantation Failure

Parrella, A., Keating, D., Cheung, S. (2019). A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(10), 2057-2066.

Piccolomini, M., Bonetti, T. C. S., Motta, E., Serafini, P. C., Alegretti, J. R. (2018). How general semen quality influences the blastocyst formation rate. *Journal Brasileiro de Reproducao Assistida*, 22(2), 89-94. <https://doi:10.5935/1518-0557.20180022>

Satar, D. A., Gençdal, S. (2013). Sperm Değerlendirmesi. *Medical Review Journal*, 22(4), 532–542. <https://doi.org/10.17827/aktd.29343>

Shirota, K., Yotsumoto, F., Itoh, H. (2016). Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertility and Sterility*, 105(2), 315-321.

Uğurlu, B. (2017). Erkek faktörünün embriyo bölünme anormallikleri üzerindeki etkisinin zaman aralıklı embriyo görüntüleme yöntemi ile incelenmesi

Vicdan, K., Işık, A. Z. (1999). *In Vitro Fertilizasyon Ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar* (1) 4–5.

Yalcinkaya Kalyan, E., Can Celik, S., Okan, O., Akdeniz, G., Karabulut, S., Caliskan, E. (2019). Does a microfluidic chip for sperm sorting have a positive add-on effect on laboratory and clinical outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles? *Andrologia*, 51(10). <https://doi:10.1111/and.13403>

Yetkinel, S., Kilicdag, E. B., Aytac, P. C., Haydardedeoglu, B., Simsek, E., Cok, T. (2019). Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(3), 403-409. <https://doi:10.1007/s10815-018-1375-2>

Yıldırım, D. (2015). Dismorfik ve normal oositlerden elde edilen embriyoların sayısal aneuploidi oranlarının ve embriyo gelişim skorlarının karşılaştırılması.

Yildiz, K., Yuksel, S. (2019). Use of microfluidic sperm extraction chips as an alternative method in patients with recurrent in vitro fertilisation failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(7), 1423-1429. <https://doi:10.1007/s10815-019-01480-3>

Zhang, B., Yin, T. L., Yang, J. A. (2015) Novel microfluidic device for selecting human sperm to increase the proportion of morphologically normal, motile sperm with uncompromised DNA integrity. *Analytical Methods*. 7(14), 5981-5988. <https://doi:10.1039/c5ay00905g>

Quinn, M. M., Jalalian, L., Ribeiro, S. (2018). Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Human Reproduction*, 33(8), 1388-1393. <https://doi:10.1093/humrep/dey239>

Wang, C., Swerdloff, R. S. (2014). Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.021>

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı



T.C.
Istanbul
YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

FEN, SOSYAL VE GİRİŞİMSSEL OLMAYAN SAĞLIK
BİLİMLERİ ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

02.02.2021

İlgi : Etik Kurul Onayı,

Sayın
Buse AYYILDIZ

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Etik Kurulunun 01.02.2021 tarih ve 2021/02-580 sayılı toplantı sonucunda "Tüp bebek tedavisinde mikro-akışkan çip (sperm chip) ve yüzdürme (swim up) yıkama yöntemlerinin embriyo gelişimine ve gebeliğe etkisi" başlıklı çalışmanız Fen, Sosyal ve Girişimsel Olmayan Sağlık Bilimleri Araştırmaları Etik Kurul Kurulumuzca oy birliği ile UYGUN bulunmuştur.

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

Araştırmanız süresince çalışmanızda özellikle yöntemler konusu ile ilgili olarak değişiklikler söz konusu olursa tekrar değerlendirilmesi gereklidir.

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

İş bu belge kurum onayı dahilinde geçerlidir.

Prof.Dr.Cuma BAYAT

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

EK-2
Anabilim Dalı Onayı



T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

12.01.2021

T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji yüksek lisans programı öğrencilerimizden danışmanlığını yürüttüğüm **Buse AYYILDIZ** 'Tüp bebek tedavisinde Mikro-akışkan Çip (Sperm Chip) ve yüzdürme (swim up) yıkama yöntemlerinin embriyo gelişimine ve gebeliğe etkisi' başlıklı bir araştırma yapmayı planlamaktadır.

Söz konusu araştırma için öğrencimiz Acıbadem Fulya Hastanesi Tüp Bebek Bölümü verileri üzerinde çalışma talep etmektedir. Verilere ulaşabilmesi adına gerekli izin ilgili birim tarafından verilmiştir. Belirtilen araştırma için Buse Ayyıldız Etik Kurul'a başvuracaktır. Gereğinin yapılmasını saygılarımla arz ederim.

Dr.Öğr.Üyesi Gül İpek Gündoğan
İYYU Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

CamScanner ile tarandı

EK-3

Hastane Onayı

20/01/2021

ACIBADEM FULYA HASTANESİ DİREKTÖRLÜĞÜ'NE

Acıbadem Fulya Hastanesi Tüp Bebek Bölümünde biyolog olarak görev yapmaktayım. "Tüp bebek tedavisinde Mikro-akışkan Çip (Sperm Çip) ve yüzdürme (Swim Up) yıkama yöntemlerinin embriyo gelişimine ve gebeliğe etkisi" başlıklı araştırmamız Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Müdürlüğü Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu ve Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu tarafından uygun bulunmuştur.

Gereğinin yapılmasını arz ederim.

Buse AYYILDIZ

Acıbadem Fulya Hastanesi

Telefon: 05069403338

E-Mail: ayyildizbuse95@gmail.com

Dr.Öğr.Üyesi Gül İpek GÜNDOĞAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Telefon: 05418581094

E-Mail: gulipek.gundogan@yeniyuzyil.edu.tr

Uygun dur.

EK-4

Aydınlatılmış Onam Formu

FORM 3



FEN, SOSYAL VE GİRİŞİMSEL OLMAYAN SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMALARI ETİK KURUL

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Değerli katılımcı, sizi **Tüp bebek tedavisinde Mikro-akışkan Çip (Sperm Chip) ve farklı sperm yıkama yöntemlerinin embriyo gelişimine ve gebeliğe etkisi** konulu araştırmaya katılmaya davet ediyoruz.

Söz konusu çalışma, bir tez çalışması gerekliliğidir.

Bu çalışmanın amacı:

İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yapılmış olan erkek faktörü olgulara ait verilerin retrospektif olarak kullanılması planlanmaktadır. Tüp bebek tedavisi uygulanmış hastalarda, farklı sperm yıkama yöntemlerinin etkisini araştırmak amacıyla hastaların embriyo gelişimi ve gebelik oluşumunu karşılaştırarak incelenmesi amaçlanmıştır. İnfertilite, daha önce düzenli ilişkiye girmelerine rağmen 1 yıl içerisinde gebelik gerçekleştirememiş çiftlerdir.İlgili olgularda embriyo gelişimi ve gebelik oluşumu sonuçlarında uygulanmış farklı sperm yıkama yöntemlerinin etkisini karşılaştırarak incelenmesi amaçlıyoruz.

Kullanılacak yöntemler:

Çalışmamızda embriyo gelişimi ve gebelik oluşturması için spermier farklı yıkama yöntemleri kullanılarak yumurtanın döl lenmesinde hangi sperm yıkama yönteminin daha başarılı olduğunu göstermek amacıyla incelenecektir. Bu çalışmada sperm hazırlama yöntemi ile embriyo gelişimi ve gebeliğe etkisini incelemek için yüzdürme (swim up) yöntemi ve Mikro-akışkan Çip (Sperm Çip) yöntemi uygulanan hastalar karşılaştırılacaktır. Yüzdürme (swim up) yönteminde semen örneği önce sperm yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra tüpün dibinde kalan pelletin üzerine sperm yüzdürme solüsyonu eklenerek iyi kalitede spermier elde etmek için kullanılmıştır. Mikro-akışkan Çipler (Sperm Çip), en iyi spermier seçilebilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Açıklamalar:

Elde edilecek tüm veriler anonim olup, tamamen gizli kalacaktır. Hiçbir veri başka bir formatta başka bir amaçla yayınlanmayacaktır. Veriler güvenli bir ortamda saklanacak ve sadece araştırmacı erişime sahip olacaktır. Herhangi bir bant kaydı veya yazılı metin kullanıcı tarafından çalışma tamamlandığında yok edilecektir. Bu çalışmaya katılım gönüllüdür. Bu çalışmaya katılmak veya katılmamak, Yeni Yüzyıl Üniversitesi ile mevcut veya gelecekteki ilişkilerinizi etkilemez. Eğer katılmaya karar vererseniz, istediğiniz zaman ayrılma hakkına sahip olup tüm verilerinizin tahrip edilmesini isteyebilirsiniz.

İletişim ve Sorular için lütfen Buse AYYILDIZ (05069403338) ile irtibata geçiniz.

Rıza Beyanı:

Sayın Buse AYYILDIZ tarafından İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ana Bilim Dalı yüksek lisans tezi için Acıbadem Fulya Hastanesinde tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramızda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine araştırma esnasında büyük özen ve saygıyla yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıyı zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekilmeden önce bunu bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim) Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerin doğrudan veya dolaylı olarak gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim.) Araştırma esnasında bir sağlık sorunuyla karşılaştığımda; her durumda Prof. Dr. Ercan BAŞTU (05324134195) arayabileceğimi biliyorum. (Adres: Dikilitaş, Hakkı Yeten Caddesi, No:23, 34349 Beşiktaş/İstanbul)

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranış ile karşılaşmadım. Eğer katılmayı rededersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceği de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım.

Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmza:**Tarih:****Araştırmacı İmzası:****Tarih:** 15/01/21

Buse AYYILDIZ

ÖZGEÇMİŞ

Adı – Soyadı: Buse AYYILDIZ

Doğum Yeri:

E-Posta:

Mezun Olduğu Lisans Programı:

Ege Üniversitesi
Fen Fakültesi

Mesleki Deneyim:

Acıbadem Fulya Hastanesi Tüp Bebek Bölümü

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

1. **Ayyıldız Buse** ve Gündoğan Gül İpek “Ishikawa Endometrium Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Portakal Ve Okaliptüs Yağının Etkisi” GEKON 2019 (Genç Eczacılar Kongresi) /Lionel Bayrampaşa Hotel Sözlü bildiri / 8-10 Mart 2019
2. Gündoğan Gül İpek, **Ayyıldız Buse**, Bakır Pınar “ID:52 MCF-7 meme kanseri hücre kültüründe Curcumin’in etkisi” EMK 2019 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Poster bildiri 24-26 Nisan 2019/ Edirne

