

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy)
Metodunu Kullanarak ICSI (Intra Cytoplasmic
Sperm Injection) İle Oositin Spermle Uygun
Fertilizasyon Zamanının Araştırılması**

MOSTAFA ASHRAFİ OSALOU

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU. HSI. PhD - 2009970196

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy)
Metodunu Kullanarak ICSI (Intra Cytoplasmic
Sperm Injection) İle Oositin Spermle Uygun
Fertilizasyon Zamanının Araştırılması**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

Mostafa ASHRAFI OSALOU

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Ülker CANKURT

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
proje 2010. KB SAG 6 – 171 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU. HSI. PhD - 2009970196

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji** Anabilim Dalı doktora programı öğrencisi, **Mostafa ASHRAFI OSALOU ‘ EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) metodunu kullanarak ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması’** konulu doktora tezini **11.06.2013** tarihinde başarılı olarak **tamamlamıştır.**

Doç. Dr. Ülker CANKURT
BAŞKAN

Prof. Dr. Seda VATANSEVER
ÜYE

Prof. Dr. Abdullah ARSLAN
ÜYE

Doç. Dr. Işıl TEKME
ÜYE

Doç. Dr. Güven ERBİL
ÜYE

Prof. Dr. Sevinç İNAN
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Çetin PEKÇETİN
YEDEK ÜYE

İçindekiler

ÖZET.....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT	Error! Bookmark not defined.
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	Error! Bookmark not defined.
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	Error! Bookmark not defined.
1.2. Araştırmanın Amacı.....	Error! Bookmark not defined.
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	Error! Bookmark not defined.
2. GENEL BİLGİLER	Error! Bookmark not defined.
2.1. Genital Sistemin Gelişimi	Error! Bookmark not defined.
2.2. Dişi Genital Sisteminin Anatomisi ve Histolojisi	Error! Bookmark not defined.
2.3. Ovaryal döngü ve Gamatogenez	Error! Bookmark not defined.
2.4. Erkek Genital Sisteminin Anatomisi ve Histolojisi	Error! Bookmark not defined.
2.5. Spermatogenez hücreleri ve spermatogenez	Error! Bookmark not defined.
2.6. Fertilizasyon.....	Error! Bookmark not defined.
2.7. Elektrokimyasal Impedans Spektroskopisi.....	Error! Bookmark not defined.
2.8. EIS ile Standart Deneyler:	Error! Bookmark not defined.
2.8.1. Potansiyostatik EIS	Error! Bookmark not defined.
2.8.2. Galvanostatik EIS:	Error! Bookmark not defined.
2.8.3. Hibrid Galvanostatik EIS:.....	Error! Bookmark not defined.
2.8.4. Çoklanmış Potansiyostatik EIS:	Error! Bookmark not defined.
2.8.5. Mott-Schottky:	Error! Bookmark not defined.
2.9. Ratın Genital Sistemi:	Error! Bookmark not defined.
3. GEREÇ VE YÖNTEM	Error! Bookmark not defined.
3.1. Araştırmanın Tipi	Error! Bookmark not defined.
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:.....	Error! Bookmark not defined.
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme /çalışma grupları:	Error! Bookmark not defined.
3.4. Yöntemin ve Grupların Şema ile Gösterilmesi:.....	Error! Bookmark not defined.
3.4.1. Yöntemlerin şeması	Error! Bookmark not defined.
3.4.2. Grupların şeması.....	Error! Bookmark not defined.
3.4.3. Grupların açıklaması:	Error! Bookmark not defined.
3.4.4. Çalışma materyali:	Error! Bookmark not defined.
3.4.5. Erkek Grubunun çalışma özeti	Error! Bookmark not defined.
3.4.6. Dişi grubunun çalışma özeti.....	Error! Bookmark not defined.
3.5. Deneyin Aşamaları	Error! Bookmark not defined.
3.5.1. Mikroçip hazırlaması	Error! Bookmark not defined.
3.5.1.1. Oosite uygun mikroçip hazırlanması.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.1.2. Oosit ölçümü için hazırlanan Gümüş Klorür elektrotu	Error! Bookmark not defined.

3.5.1.3.	<i>Elektriksel yöntemle gümüş telin ince bir AgCl tabakasıyla kaplanması</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.2.	<i>Vasektomi işlemi</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.3.	<i>Süperovulasyon işlemi</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.4.	<i>Mikroskopik Epididimal Sperm Aspirasyon</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.5.	<i>ICSI yöntemine göre oosit toplama işlemi</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.6.	<i>Toplanan oositlere uygulanan işlemler</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.7.	<i>Toplanan oositlerin ICSI işlemi için yapılan hazırlıklar</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.8.	<i>Yalancı gebelik grubu (B₂) hazırlanması</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.9.	<i>Embriyo transferi</i>	Error! Bookmark not defined.
3.6.	Araştırmanın Değişkenleri:	Error! Bookmark not defined.
3.7.	Veri toplama araçları:	Error! Bookmark not defined.
3.7.1.	<i>Araştırmada kullanılan demirbaş malzemeler:</i>	Error! Bookmark not defined.
3.7.2.	<i>Araştırmanın yöntemleri</i>	Error! Bookmark not defined.
3.8.	Araştırmanın Planı ve Takvimi:	Error! Bookmark not defined.
3.9.	Verilerin değerlendirilmesi:	Error! Bookmark not defined.
3.10.	Araştırmanın sınırlılıkları:	Error! Bookmark not defined.
3.11.	Etik Kurul Onayı	Error! Bookmark not defined.
4.	BULGULAR	Error! Bookmark not defined.
4.1.	B_{2,2,2} Grubu (ICSI+/ EIS -): EIS yönteminden yararlanmadan ICSI uygulanması ...	Error! Bookmark not defined.
4.1.1.	<i>B_{2,2,2} (ICSI+/ EIS -) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi:.....</i>	Error! Bookmark not defined.
4.2.	B_{2,2,1} (ICSI+/EIS +):EIS yönteminden yararlanan oositler	Error! Bookmark not defined.
4.2.1.	<i>2,2,1 (ICSI+/ EIS +) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi:.....</i>	Error! Bookmark not defined.
4.3.	B_{2,2,1} (ICSI+/ EIS +) ve B_{2,2,2} (ICSI+/ EIS -) grupları arasında karşılaştırma:	Error! Bookmark not defined.
4.4.	EIS ile elde edilen verilerin değerlendirmesi:	Error! Bookmark not defined.
4.4.1.	<i>B_{2,2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 1. deneğin EIS verilerinin aralığı:</i>	Error! Bookmark not defined.
4.4.2.	<i>B_{2,2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 2. deneğin EIS verilerinin aralığı:</i>	Error! Bookmark not defined.
4.4.3.	<i>B_{2,2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 3. deneğin EIS verilerinin aralığı:</i>	Error! Bookmark not defined.
4.4.4.	<i>B_{2,2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 4. deneğin EIS verilerinin aralığı:</i>	Error! Bookmark not defined.
4.4.5.	<i>B_{2,2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 5. deneğin EIS verilerinin aralığı:</i>	Error! Bookmark not defined.

- 4.5. B_{2.2.1} (ICSI+/EIS+) grubundaki oositlerin EIS ile elde edilen sonuçlarına ait çizelge:
Error! Bookmark not defined.
- 4.6. Karşılaştırma amaçlı olgun olmayan oosit için EIS çizelgesi: Error! Bookmark not defined.
- 4.7. ICSI+/EIS+ verilerin varyasyon hesaplaması:Error! Bookmark not defined.
- 4.8. EIS ile Seçilen Oositlerin Fertilizasyon EIS Potansiyel Penceresinin Belirlemesi: Error!
Bookmark not defined.
5. TARTIŞMA:Error! Bookmark not defined.
6. SONUÇ VE ÖNERİLER:Error! Bookmark not defined.
7. KAYNAKLAR:Error! Bookmark not defined.
8. EKLER:.....Error! Bookmark not defined.
- 9.1. Etik Onayı:.....Error! Bookmark not defined.
- 9.2. Etik Onayı:.....Error! Bookmark not defined.
10. ÖZGEÇMİŞ:.....Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Germ hücreleri ve gonadların kökeni	9
Şekil 2: Germ hücrelerin göçü.....	9
Şekil 3: Testis ve ovaryum gelişimi	11
Şekil 4: Dişi iç genital sisteminin iç organları	15
Şekil 5: Ovaryum ve evreleri	17
Şekil 6: Erkek genital sistem	19
Şekil 7: Testisin Histolojik Yapısı	22
Şekil 8: Testisin anatomisi ve kanalları	22
Şekil 9: Spermatogenez	26
Şekil 10: Fertilizasyon ve Aşamaları	28
Şekil 11: EIS 300 sistemi	29
Şekil 12: EIS için hazırlanan farklı oosit mikroçipler	41
Şekil 13: EIS için hazırlanan farklı oosit mikroçipler	41
Şekil 14: EIS için hazırladığımız tek haneli oosit mikroçipi.....	41
Şekil 15: EIS için hazırladığımız tek haneli oosit mikroçipi	41
Şekil 16: EIS ölçümü için 5 haneli oosit mikroçipi	41
Şekil 17: EIS ölçümü için 14 haneli oosit mikroçipi	41
Şekil 18: Referans elektrotun şeması	42
Şekil 19: Mikroelektrot	42
Şekil 20: Mikroelektrot	43
Şekil 21: Mikroelektrot (Ross).....	43
Şekil 22: Hazırlanmış referans mikroelektrotlar	44
Şekil 23: ‘Microdrive’ üstüne monte edilmiş referans mikro elektrot	44
Şekil 24: EIS cihazı ile Ag telin ince bir gümüş klorür (AgCl) tabakasıyla kaplanması .	44
Şekil 25: Ag/AgCl solüsyonu	44
Şekil 26: E11 Rat’ın sağ duktus deferens vasktomisi	45
Şekil 27: E11 Rat’ın dikiş sonrası	45
Şekil 28: E11 Rat’ın vasktomi sonrası	45
Şekil 29: MESA uyguladığımız erkek rat	46
Şekil 30: MESA yöntemini uygularken epididimin kaudası görülmekte	46
Şekil 31: MESA aspirasyonu	47
Şekil 32: Sperm aspirasyonu	47
Şekil 33: Spermilerin falkona aktarılması	47

Şekil 34: Rat sperm sayımı (Neubauer lam).....	47
Şekil 35: Rat tuba uterina ve ovaryumu	48
Şekil 36: Bir damla ortam içinde yeni toplanmış oositler($\times 100$).....	48
Şekil 37: Oositin EIS yöntemi ile değerlendirilmesi	49
Şekil 38: Hazırladığımız mikroçip içinde referans elektrotun yerleşimi	49
Şekil 39: Hazırladığımız mikroçip içinde referans elektrotun yakından görünümü.....	49
Şekil 40: Hazırladığımız mikroçip oosite çok yakın ölçüm halinde	49
Şekil 41: MESA; Sperm aspirasyon.....	51
Şekil 42: ICSI 2.aşaması	51
Şekil 43: ICSI 3.aşaması	51
Şekil 44: ICSI 4.aşaması).....	51
Şekil 45: ICSI 5.aşaması	51
Şekil 46: ICSI 6.aşaması	51
Şekil 47: Seçilen oosit	53
Şekil 48: Seçilen oosit pipetleme aşamasında	53
Şekil 49: ICSI işlemine hazırlanan oosit	53
Şekil 50: ICSI işlemine hazırlanan oosit	53
Şekil 51: ICSI işleminden yaklaşık 14 saat sonra ($\times 200$).....	53
Şekil 52: ICSI işleminden yaklaşık 16 saat sonra ($\times 400$).....	53
Şekil 53: Fertilizasyon sonrası 16.-18. Saat	54
Şekil 54: Fertilizasyon sonrası 16.-18. Saat	54
Şekil 55: Fertilizasyon 1. Günü.....	54
Şekil 56: Fertilizasyon 2. Günü	54
Şekil 57: Fertilizasyonun 2. günü sonu	54
Şekil 58: Fertilizasyonun 3. günü	54
Şekil 59: Fertilizasyonun 5. günü.....	55
Şekil 60: Fertilizasyonun 5. günü.....	55
Şekil 61: Şematik olarak transfer pipetinin hazırlanması	55
Şekil 62: Rat uterusun anatomisi ve ayrıntıları	55
Şekil 63: Şematik olarak transfer işlemi	55
Şekil 64: Anestezi edilip, traşlanmış yalancı gebelik grubuna ait rat	56
Şekil 65: Operasyon bölgesi batikonla dezenfekte edildi	56
Şekil 66: Operasyon bölgesinde 0,5 -1 cm bir kesi (Ok).....	56
Şekil 67: küçük kesiden uterus bulunup dışarı çıkarıldı (Ok)	56

Şekil 68: Uterus steril gazlı bez ile sabitlendi	56
Şekil 69: Uterus pensetle sabitlendi ve pipetle embriyolar transfer edildi	56
Şekil 70: Transfer sonrası dikiş atıldı	57
Şekil 71: Diğer boynuza da aynı transfer işlemi uygulandı	57
Şekil 72: Transfer sonrası kafeste tek olarak tutuldu,.....	57
Şekil 73: Transferden 2 gün sonra,.....	57
Şekil 74: Transferden 18 gün sonra doğum yapan anne	57
Şekil 75: Yavrular 3 hafta laktasyon sonrası Deney Hayvanları AD' na teslim edildi ...	57

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Yöntemlerin çalışma özeti	33
Tablo 2: Grupların çalışma özeti	34
Tablo 3: Erkek grubunun çalışma özeti	37
Tablo 4: Dişi grubunun D1 – D20 çalışma özeti	38
Tablo 5: Dişi grubunun D21 – D40 çalışma özeti	39
Tablo 6: Araştırmada kullanılan demirbaş malzemeler	59
Tablo 7: EIS(-) grubuna ait veriler	62
Tablo 8: (ICSI+/ EIS -) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi	63
Tablo 9: EIS(+) grubuna ait veriler	64
Tablo10: (ICSI+/ EIS +) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi	65
Tablo11: ICSI +/ EIS (+) arasında varyasyon miktarının değişimi.....	71

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1: EIS(-) grubuna ait veriler.....	62
Çizelge 2: EIS(-) grubundaki fertilizasyon, transfer ve doğum sayıları	63
Çizelge 3: EIS(+) grubuna ait veriler	64
Çizelge 4: EIS(+) grubundaki fertilizasyon, transfer ve doğum sayıları	65
Çizelge 5: EIS(+)/EIS(-) grubundaki fertilizasyon, transfer ve doğum sayıları	67
Çizelge 6: B 2.2,1 (ICSI+/ EIS +) grubunun 1. deneğe ait EIS ölçümü	67
Çizelge 7: B 2.2,1 (ICSI+/ EIS +) grubunun 2. deneğe ait EIS ölçümü	67
Çizelge 8: B 2.2,1 (ICSI+/ EIS +) grubunun 3. deneğe ait EIS ölçümü	68
Çizelge 9: B 2.2,1 (ICSI+/ EIS +) grubunun 4. deneğe ait EIS ölçümü	69
Çizelge 10: B 2.2,1 (ICSI+/ EIS +) grubunun 5. deneğe ait EIS ölçümü	69
Çizelge 11: ICSI(+)/EIS(-) gruplarındaki olgun bir oositteki EIS ölçümünün çizelgesi	
	69
Çizelge 12: ICSI +/EIS+ gruplarındaki olgun olmayan bir oositteki EIS ölçümünün çizelgesi.....	70
Çizelge 13: ICSI +/ EIS (+) arasında varyasyon miktarının değişimi	72
Çizelge 14: - EIS ile Seçilen Oositlerin Fertilizasyon EIS Potansiyel Penceresinin blirlemesi.....	73

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji eğitimim boyunca daima yol gösterici olan, tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, her konuda desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Ülker CANKURT'a,

Doktora eğitimime katkılarını sağlayan Prof. Dr. Kazım TUĞYAN, Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Doç. Dr. Işıl TEKMEK, Doç. Dr. Güven ERBİL, Doç. Dr. Bekir ERĞUR, Doç. Dr. Çetin PEKÇETİN, değerli tez komitesi ve jüri üyelerime,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Seda ÖZBAL'a, Serap CİLAKER MICİLİ, biyolog Sedef MENKÜ ve Özcan ÜSTÜN'e,

Doktoraya başladığım günden beri daima yanımda olan sevgili eşim Nazanin ZOLFAGHARI, oğlum Artin ASHRAFI OSALOU'a,

Ana bilim dalımızın 2009-2013 YL öğrencisi arkadaşlarıma,

Her sabah bölümde güler yüzle beni karşılayan değerli arkadaşlarım Dilek BACIK ve Ahmet KIRBULUT'a

Tüm eğitim hayatım boyunca ve attığım her adımda beni yalnız bırakmayan, daima destekleyen aileme ve hocalarıma, teşekkürü borç bilirim.

EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) metodunu kullanarak ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması

Mostafa ASHRAFI OSALOU

DEU, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, İnciraltı 35340- İzmir / Türkiye

maomostafa@gmail.com , maomostafa@ogr.deu.edu.tr

ÖZET

Tüp bebek merkezlerinde uygun gamet seçimi için çok fazla zaman harcanmasına rağmen, günümüzdeki Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) ya başarısızdır ya da düşük bir başarı yüzdesine sahiptir. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) tekniği, biyofizik ve kimya kökenli bir metottur. Hücreler, sitoplazma ve organelleri ile biyofizik ve biyokimya kurallarına tamamen uyarlar. Bu birimler yapılarına dayanarak, özel direnç, potansiyel ve elektriksel davranışlara sahiptirler.

Toplam 55 adet, 8-16 haftalık 220-250gr ağırlığında Wistar Albino rat Dokuz Eylül Üniversitesi'nin Deney Hayvanları Anabilim Dalından temin edildi (Grup A₁, A₂, A₃ toplam 15 adet erkek) ve 40 adet dişi (B₁, B₂, B₃). Vasektomi grubundaki (A₂) 5 adet erkek rat deneyin 10 gün öncesi ketasol ile anestezi altında vasektomi yapıldı. Sperm aspirasyon grubundan (A₁, A₃) MESA yöntemi ile ICSI için sperm temin edildi. B₁ ve B₃ gruplarının östrus evresi smear yaymasıyla tespit edildi, süperovulasyon yapıldı ve oositleri toplandı. EIS yöntemiyle elektriksel potansiyel ölçümü için oosit boyutuna uygun mikroçip hazırlandı. YÜT kriterlerine göre seçilen oositlerin yarısı EIS ile değerlendirilirken diğer yarısına EIS uygulanmadı. Seçilen tüm oositlere ICSI yapıldı. Önceden hazırlanan dişi ratlara anestezi altında 3.gün 4 ile 14 embriyo transfer edildi. Tüm veriler istatistiksel olarak T-Student testi ve SPSS 15 programı ile değerlendirildi.

EIS ile seçilen 58 oositin EIS kullanmadan seçilen 57 oosite göre; fertilizasyon oranı, embriyo transfer oranı daha başarılı olduğu görüldü. Bu çalışmada ratlarda fertilizasyon için uygun oositin 'elektriksel EIS fertilizasyon penceresi'nin 118 ile 132 mV arasında olduğu ilk kez gösterildi.

Anahtar Sözcükler: EIS, YÜT, Vasektomi, Fertilizasyon EIS Potansiyel Penceresi (FEPP)

Applying EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) to determine the most appropriate oocyte fertilization time for ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) in Rats

Mostafa ASHRAFI OSALOU

Dokuz Eylul university (DEU), School of Medicine, Department of Histology & Embryology
inciralti, 35340, Izmir/Turkey. maomostafa@gmail.com, maomostafa@ogr.deu.edu.tr

ABSTRACT

Current use of Assisted Reproductive Techniques in IVF centres are very time-consuming and often amount to a low success-rate or even failure of selecting appropriate gametes often. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) technique is a method that originated in biophysics and chemistry. Therefore, the rules of biophysics and biochemistry underlie how cells, the cytoplasm and organelles adapt. These (sub) cellular units have specific resistance and electrical behaviour potential, based on their biological structures.

A total number of 55 Wistar albino rats (8-16 weeks, 220-250g) were obtained from Dokuz Eylul University department of Experimental Animals (15 males in groups A₁, A₂ and A₃; and 40 female in groups B₁, B₂, B₃). Vasectomy group (A₂), comprised of 5 males that were vasectomized under ketasole anaesthesia 10 days before experimental onset. Remaining 10 males in the sperm aspiration groups (A₁, A₃) were undergoing Microsurgical Epididymis Sperm Aspiration (MESA) to produce sperm for ICSI. Oestrous phase of female rats of groups B₁ and B₃ was detected by Pap smear, after which these females were induced to super-ovulate. A microchip, suitable for the size of oocytes, was prepared for EIS measurement of electric potential. Half of all collected oocytes were evaluated by EIS, while the other half only benefited assisted reproductive techniques. ICSI was then performed on all selected oocytes. After successful ICSI, 4 to 14 third day staged embryos were transferred into previously prepared, anesthetized pseudo-pregnant rats. All data were evaluated by T-student and SPSS.

58 oocytes selected by the EIS appeared more successful in fertilization and embryo transfer as compared to 57 oocytes selected only by ART.

We found, for the first time, that an EIS fertilization window of 118 to 132 mV defines suitable mature oocytes for fertilization in rats defined.

Key Words: EIS, ART, Vasectomy, Fertilization EIS Potential Window (FEPW)

1. GİRİŞ VE AMAC

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

İnsan gelişimi fertilizasyon ile başlar. Normal fertilizasyon için oosit ve spermin varlığı ve sağlığı önemli bir koşuldur. Erkek gameti olan sperm ile kadın gameti olan oositin (ovum) bir araya gelerek, tek hücreli bir yapı olan zigotu oluşturmaya fertilizasyon denir. Bu çok özel totipotent hücre, kendimize ait benzersiz yapının başlangıcıdır. Fertilizasyon esas moleküler faktörlere dayanır(1, 2). Normal ve yeterli androjenler, sağlam genital sistem ve normal gamet bulunması gereklidir. Çeşitli faktörler infertilite nedeni olabilir. Canlıların özel durumlarına bağlı olarak üreme yollarının sağlıklı olmasına rağmen, normal ve sağlıklı gametler bulunmayabilir (3). Uygun olmayan gamet hücreleri başarısız fertilizasyon nedeni olabilir(4). Özellikle oligospermi (3, 5, 6) olan erkeklerde ve Poli Kistik Over hastalığı (PCO)(4, 5, 7) olan kadınlarda fertilizasyon oranı düşüktür.

Günümüzdeki yöntemlerle uygun gamet seçimi için çok fazla zaman harcamasına rağmen ya başarısızdır ya da düşük bir başarı yüzdesine sahiptir. Bu sorunlar üretim tesisleri ve veteriner hekimlikte de görülmektedir(8, 9).

20. yüzyıldan beri infertilite sorununu çözmek için çeşitli yöntemler kullanılır(10). Bunlar; ilaçlar (örn. Androjenler, Gonadotropinler, Antiöstrojenler), cerrahi yöntemler (örn. Varikoselektomi, Vasovasostomi, Vasoepididimostomi) ve YÜT [örn. GIFT (Gamet Intra Fallopian transfer) – ZIFT (Zigot Intra Fallopain transfer)– IUI (Intra Uterin İnseminasyon) – IVF (In Vitro Fertilizasyon)] dir (9-12). Bu yöntemlere rağmen yine de kesin ve yeterli bir başarı sağlanamamıştır(11).

Lanzendorf ve ark., Hamster'in oositine bir sperm enjeksiyonu sonrası çekirdeğinin yoğunluğunun azaldığını, spermelerin %90'ında akrozom reaksiyonu olduğunu rapor etmişlerdir. 1988 yılında Lanzendorf ve ark., bir diğer araştırma grubuyla insanda %30 fertilizasyon oranı bildirmişlerdir. Dolayısıyla enjeksiyondan sonra çok sayıda dejenere oosit olduğu rapor edilmiştir (12).

Bir hücre ya da organizmanın tüm yapısı gen haritasının ekspresyonundan çizilir fakat genler ancak özel koşullarda, uygun ihtiyaç ve belirli zamanlarda aktif olurlar (11). Hücre zarı ve reseptörleri normal koşullarda, bir kimlik ve yapıya sahiptirler (11). Tıp dünyasında ve yaşam sürecinde, bir implantasyonun kabul veya reddedilmesini önemli ölçüde bu yapılar düzenler (2-4). Her organik ve inorganik madde özel bir yapı ile atom ve molekülleri belli olan bir haritaya sıralanmıştır (4, 13). Bir polar veya apolar molekülde, pozitif ve negatif yük

parçacıkları, temel bir yapı özelliğini korumak için bir araya gelirler. Yapının özellikleri onların manyetik bir alanda elektriksel davranışlarını belirler(13, 14). Bu nedenle her hücre için standart parametreler ile kolay ve istikrarlı tablo sunmak gerekli görünüyor (14). Canlı dünyası diğer nesneler gibi moleküller ve atomlardan oluşur. Dolayısıyla bu birimler; yapılarına dayanarak özel direnç, potansiyel ve elektriksel davranışlara sahiptirler. Bu yapısal ve biyofizik parametreler ölçülebilir. EIS tekniği, fizik ve kimya kökenli bir metottur. EIS tekniği birçok araştırmada kullanılmıştır. Örneğin; yanıklarda iyileşme miktarı ve zamanı, yara iyileşmesi, kalp krizinde kalp dokusunun iyileşmesi, dokuların iyileşmesi, laboratuvarda hücrelerin tanınması, (15-18). Son derece hassas, hatasız ve kullanımı kolay, çalışma alanı kontrolü olan EIS yöntemi (15-18) ile her hücrenin özel parametreleri elde edilebilir. Hatta hücre kültürü çalışmalarında bu yöntem ile hücreler tek sıra ve tek tabakada dizilirler. Bu yöntem ile yanıklarda yanık iyileşmesi ve doku yenilenmesi kolaylaştırılır (15-17).

Çalışmamızda ilk kez EIS tekniği ile oositin yapısına bağlı olarak uygun fertilizasyon zamanı kantitatif olarak belirlendi.

1.2. Araştırmanın Amacı

EIS yöntemi ile oositin fertilizasyon için uygun zamanının ve özelliklerinin bulması.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

EIS metodunu kullanarak ICSI ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması mümkün olabilir.

Hücrenin büyüme, üreme ve bölünme zamanını kolay ve kesin olarak yeni parametrelerle sunmak.

Araştırma, tüp bebek merkezlerinde fertilizasyon oranını arttırmak için kullanılabilir. Bu şekilde Tüp bebek merkezlerinin masraflarının azaltılması ve zamandan tasarruf sağlanması mümkün olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

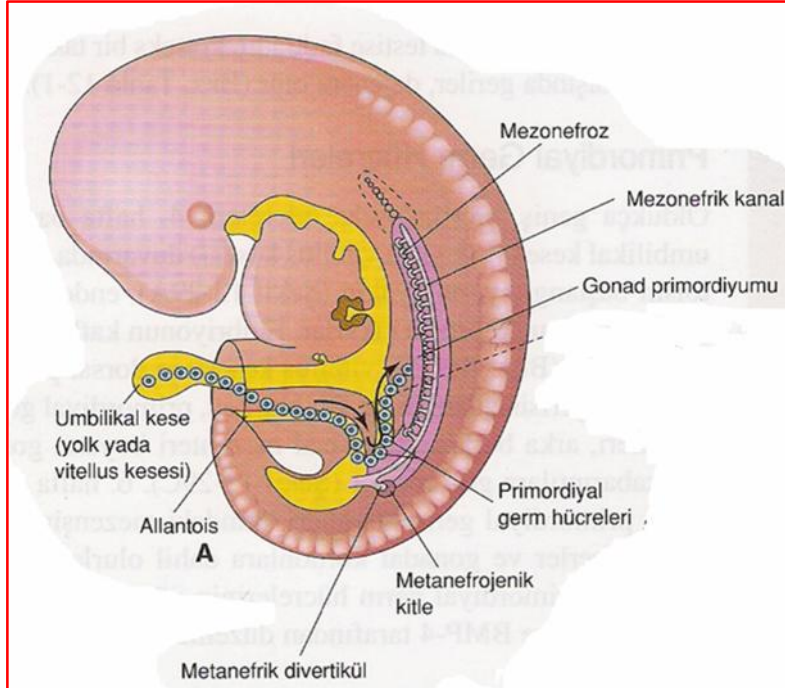
2.1. Genital Sistemin Gelişimi

Erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonun 7. haftalarına kadar gelişime başlamazlar (1, 2, 4). Genital sistem erken dönemde her iki cinsiyette birbirine benzer, seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası olarak adlandırılır (1, 2). Gonadlar (testisler ve ovaryumlar) üç kaynaktan köken alırlar: 1. Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel), 2. Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve 3. primordiyal germ hücreleri (1-4, 18-21).

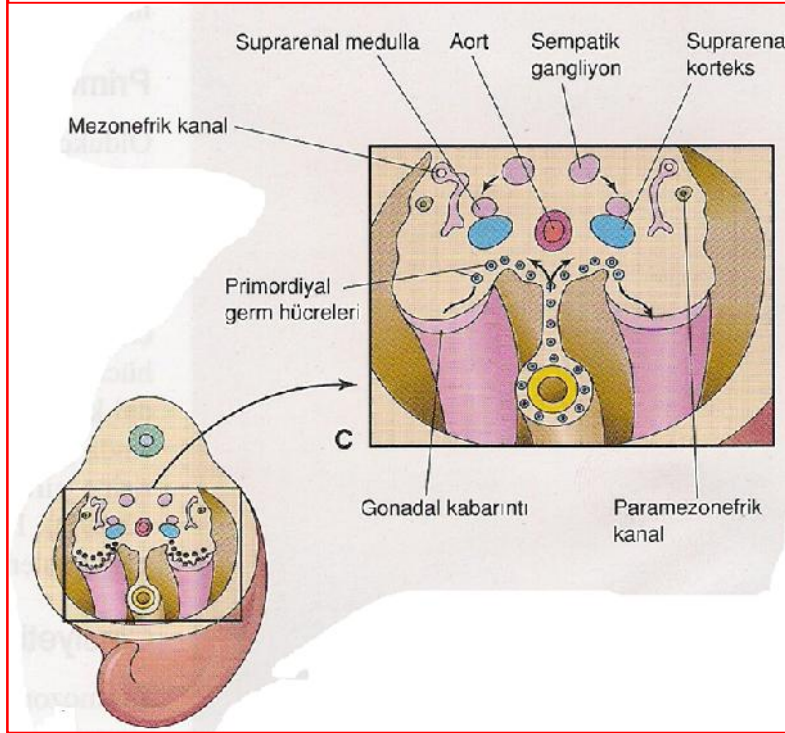
Beş haftalık embriyoda, Primordiyal Germ Hücrelerinin (PGC) vitellüs kesesi duvarından, embriyo içerisine göçü izlenmektedir (1, 2, 4, 5, 18). Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar ve mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık (gonadal kabartı) oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar (gonadal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler (Şekil 1, 2) (1, 2, 18, 20, 21).

Primitif gonadın kortikal bölgesinden ovaryum gelişir. Farklılaşmamış gonadın kortikal bölgesi, başlangıçta primer seks kordonları içerir. Bu kordonlar, 5.haftada sölom epitelinden mezenşimin içine uzanır ve 6. haftada, primer hücre kordonlarındaki hücreler dejenere olur ve bunların yerini, oogonyomların etrafını çevreleyen sekonder seks kordonları alır (1, 2, 18, 21). Oogonyomlar, vitellus kesesinden gelişip göç eden primordiyal germinal hücrelerin mitoz bölünmesiyle oluşur. Primordiyal germinal hücreler, iki X kromozomuna sahiptir ve SRY geni tarafından kodlanmış Testis-Belirleyen Faktörden (TBF) yoksundur (22, 23).

Fötal ovaryumda, oogonyomlar primer oosit olmak için 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girer ve crossing over'in tamamlanmasından sonra bu evrede bekler. Mayoz'un profaz evresinde bekleme; bir ya da daha çok follikülün gelişmesi için uyarıldığı ergenliğe kadar devam eder (1, 2, 4, 5, 18).



Şekil 1: Germ hücrelerinin ve gonadların kökeni



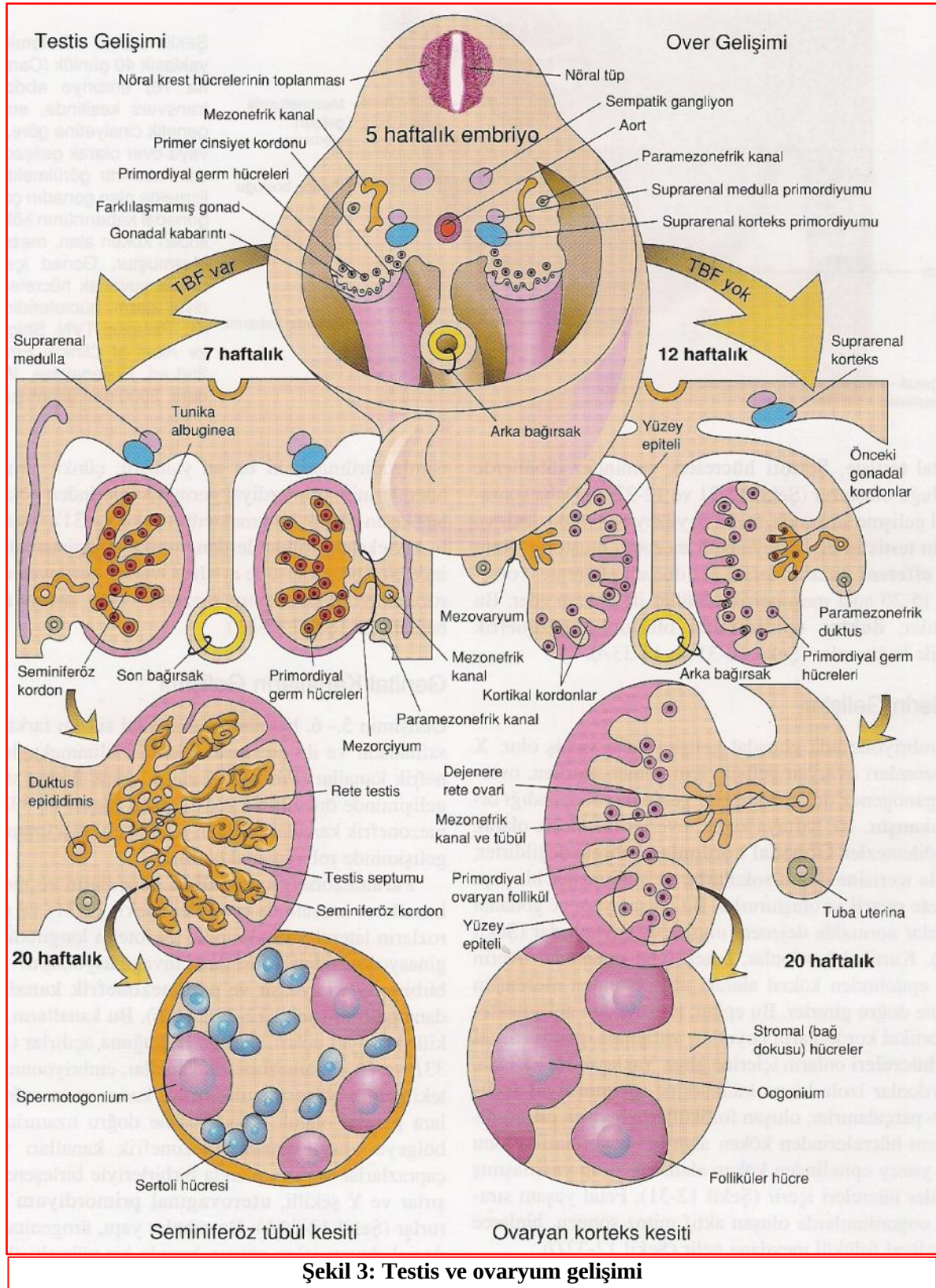
Şekil 2: Germ hücrelerinin göçü

Beşinci ile 6. haftalarında, genital sistem farklanmamış safhadadır ve iki çift genital kanal bulunmaktadır (1, 2, 19, 20). Paramezonefrik kanallar, gonodların ve mezonefrik kanalların lateralinde gelişirler. Mezonefrozların lateral yüzeylerinde, mezotelin longitudinal invaginasyonlarından oluşurlar. İnvaginasyonların kenarları birbirleriyle kaynaşır ve

paramezonefrik kanallar meydana gelirler. Bu kanalların, huni şekilli kraniyal uçları, periton boşluğuna açılırlar. Paramezonefrik kanallar, embriyonun gelecekteki pelvik bölgesine ulaşıncaya kadar, mezonefrik kanallara paralel olarak, kaudal yöne doğru uzanırlar (1, 2). Pelvik bölgeye ulaştıklarında, mezonefrik kanalları ventralde çaprazlarlar, orta planda birbirleriyle birleşerek kaynaşırlar ve Y şekilli uterovaginal primordiyum'u oluştururlar. Bu tübüler yapı, ürogenital sinüsün dorsal duvarına doğru uzanır, burada bir yükselti (kabartı) olan sinüs tüberkülünü oluşturur (1, 2).

Cinsiyetin farklanması, bir kısmı otozomal olan çok sayıda genin rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Her ne kadar embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, oositi döleyen sperm ile fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamaz. Genital sistem gelişirken bu dönemde her iki cinsten de birbirine benzer. Cinsiyetin belirlenmesindeki anahtar, Y kromozomunun kısa kolunda "Testis Belirleyici Faktör" (TDF) geninin ekspresyonudur. Bu faktörün varlığı veya yokluğu gonadal farklanmayı doğrudan etkiler ve Y kromozomunda yerleşmiş olan birçok genin rudimenter cinsiyet organlarının kaderini tayin etmek için harekete geçmesini sağlar. Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Eitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu sonucu mezonefrozun medialinde bir kabarıklık meydana gelir. Bu kabarıklık "Gonadal kabartı (şişkinlik)" adını alır. Parmak şeklindeki eitelial kordonlar (gonodal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşur. Eğer embriyo XX seks kromozomuna sahip ise farklanmamış gonadın korteksi overe differensiye olur, medullası geriler (1-8, 19-22, 24). Embriyo XY kromozom kompleksini içeriyorsa, medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur. Fetal testiste, sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki fetal gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent kanalcıkları oluşturan,

15 ile 20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu kanalcıklar, duktus epididimis'i oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar (Şekil 2, 3) (2, 6, 13, 23).



Şekil 3: Testis ve ovaryum gelişimi

2.2. Dış Genital Sisteminin Anatomisi ve Histolojisi

Dış üreme sistemi; iç genital organlar (ovaryum, tuba uterina, uterus ve vagina) ve dış genital organlardan (klitoris, labiya majora, labiya minora, vestibul ve vestibular bezler) oluşur (1, 2, 18, 21).

Tuba uterina fertilizasyonun olduğu ve zigotun ilk yarıklanmaya başladığı yerdir. Her tüp dört anatomik bölgeye ayrılır:

1. İfundibulum: Proksimalde fimbriyaların bulunduğu bölüm
2. Ampulla: Uzun ve ince duvarlı bölüm
3. İstmus: Kısa ve kalın duvarlı bölüm
4. İntramural: Uterus lümenine açılan bölüm.

İfundibulumda, fimbriya denilen çok sayıda parmak benzeri mukozal uzantılar bulunur. Ampulla ve istmusta, tüpün lümenine doğru uzanan mukozal kıvrımlar vardır. istmusta mukozal kıvrım sayısı azdır. Tuba uterinaların duvarı üç tabakalıdır:

- 1) Mukoza tabakası
- 2) Kas tabakası
- 3) Seroza tabakası.

Mukoza epitelisi tek katlı silindirik hücrelerden oluşmuştur. Epitelde hormonların kontrolü altında olan iki tip hücre bulunur:

1) Silli hücreler. Bu hücreler, follikülogenez evresinde ve östrojen üretimi olduğunda genişler ve sil üretir (silogeneze). Progesteron sil vuruşunu artırır. Lutealiz sırasında silli hücreler sillerini kaybeder (desiliyasyon).

2) Silsiz salgı hücreleri (Peg hücreleri). Bunların salgılama etkinliği de progesteron tarafından uyarılır.

Kas tabakası içte sirküler seyirli ve dışta uzunlamasına seyirli kaslar içerir. Kas tabakası peristaltik kontraksiyonu ile döşeyici epitelin sil aktivitesi, oosit ya da zigotun uterusu doğru ilerlemesini sağlar. Uterus tüplerinin yüzeyi, peritonun mezoteli ile çevrilidir. Serozada büyük kan damarları görülür (1-5).

Uterus rektum ve mesane arasında yerleşmiş, kalın musküler duvarlı bir kesedir. Perineal uçta vaginaya açılır. İki üst köşede ise tuba uterinalar, uterusu açılırlar. Uterus gebelik sırasında yapı, büyüklük ve pozisyonunu geniş çapta değiştirebilir, önden arkaya basık bir armut gibidir. 7.5 cm boy, 5 cm genişlik, 2.75 cm kalınlıkta ve 30-40.gr ağırlığındadır. Yapı ve fonksiyon

bakımından korpus ve serviks diye iki kısma ayrılır, ikisi arasındaki daralmış kısma isthmus denir. İsthmusun iç kısmında ostium uteri internum bulunur (1, 2, 7, 18-21).

Korpusun duvarı üç tabakalıdır:

a) Endometriyum, b) Miyometriyum c) Perimetriyum

Duvarın ana bileşeni, endometriyum denilen mukoza ile döşeli miyometriyumdur.

Miyometriyum, en kalın tabakadır ve pek belirgin olmayan dört kas tabakasından oluşmuştur: Orta tabaka kalındır ve sirküler seyirli kas lifleri ile çok miktarda kan damarı içerir. Bu nedenle vasküler (damarlı) tabaka denir. İç ve dış tabakada uzunlamasına ya da oblik seyirli kas lifleri bulunur (Şekil 11). İçten dışa doğru miyometriyumda bu tabakalar vardır (1-5, 7, 23):

- 1) Stratum Submukoza: Longitudinal,
- 2) Stratum Vaskulare: Sirküler kas tabakası, kan damardan zengin,
- 3) Stratum Supra Vaskulare: Sirküler, longitudinal
- 4) Stratum Subseroza: Longitudinal kas tabakası

Kas fibrilleri arasında kollajen fibrillerden zengin bağ doku var. Gebelik sırasında, miyometriyal düz kaslar büyür (hipertrofi) ve lif sayısı artar (hiperplazi). Gebelik sırasında miyometriyal kontraksiyonların baskılanması, ovaryum ve plasentadan salgılanan bir peptid hormon olan Relaksinin kontrolü altındadır. Doğum sırasındaki miyometriyal kasılmalar ise nörohipofizden salgılanan oksitosinin kontrolü altındadır. Endometriyum, tek katlı silindirik epitel ile döşelidir. Epitel hücreleri, basit tübüler endometriyal bezlerin epiteli ile devam eder.

Epitel hücrelerinin altında endometriyal stroma denilen lamina propriya bulunur (Şekil 4). Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan oluşur (23):

- 1) Menstruasyon sırasında dökülen yüzeyel fonksiyonel tabaka.
- 2) Menstruasyon sırasında dökülmeyen ve menstruasyondan sonra yenilenecek olan fonksiyonel tabakaya kaynak oluşturan bazal tabaka.

Fonksiyonel tabakanın mikroskopik özellikleri, menstrual siklusun evrelerine göre değişiklik gösterir. Menstrual siklus yaklaşık 28 gün sürer; ancak, zamanla küçük değişiklikler olabilir. Menstrual siklus, birbirini izleyen üç evreden oluşur:

- 1) Siklusun başlangıcı olan menstrual evre (1-5 gün).
- 2) Proliferasyon evresi (östrojenik ya da folliküler evre de denir) 5-14. günler arasındadır. Bu evre sırasında, olgunlaşan ovaryum folliküllerinde üretilen östrojenin uyarıcı etkisiyle endometriyumun kalınlığı artar. Hem epitelde ve hem de lamina propriyadaki

hücrelerde mitoz görülür. Tübüler bezlerin epitel hücreleri yukarıya doğru göç eder, bez giderek daralır ve kıvrımlı bir şekil alır.

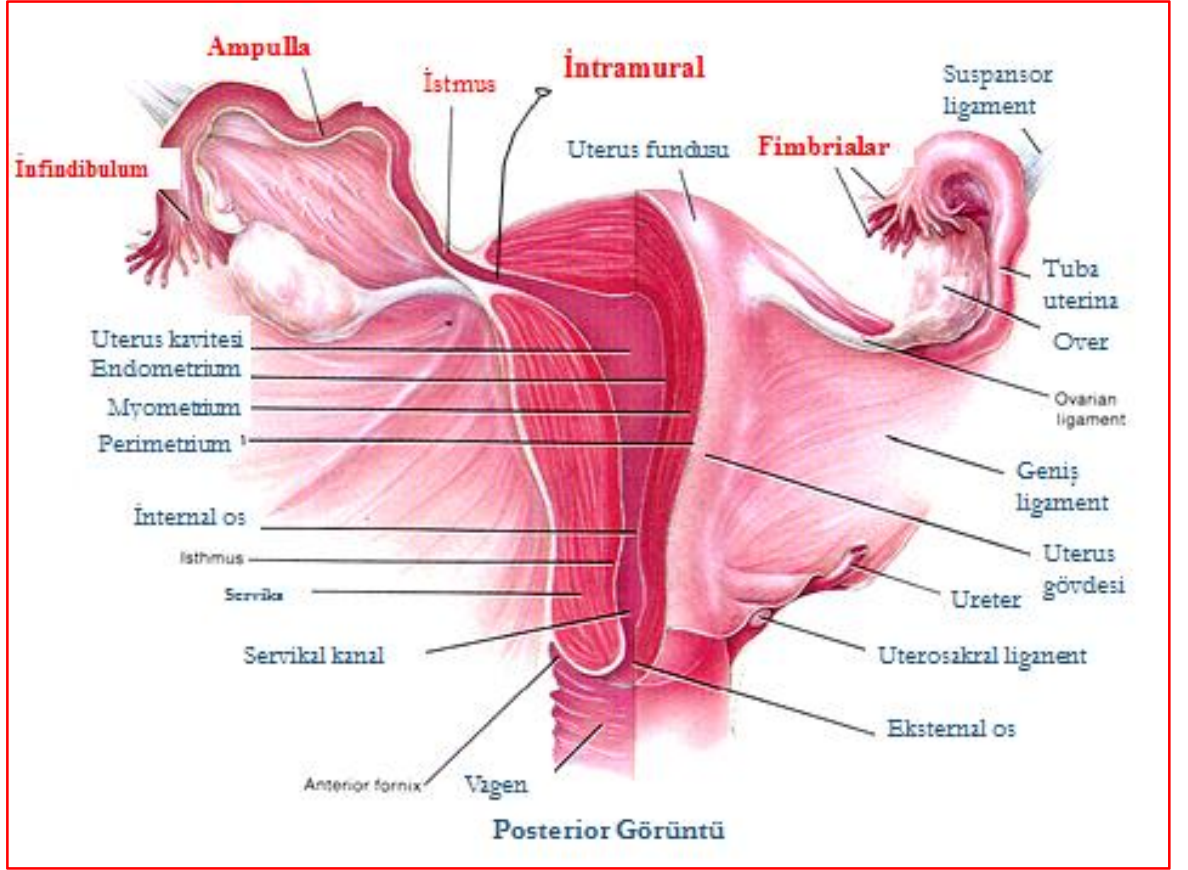
3) Ovulasyonun olduğu 14. günden sonra, endometriyum yaklaşık 13 gün sürecek olan sekresyon evresine girer. Bu evre sırasında endometriyal bezler salgılama yapmaya başlar. Tübüler bezlerin dış sınırları düzensizleşmeye ve kıvrılmaya, döşeyici epitelde glikojen birikmeye başlar ve bez lümenini glikojen ve glikoproteinden zengin bir salgı doldurur. Endometriyal bezlere paralel seyreden damarların boyu uzar ve lamina propriyada çok miktarda sıvı birikir (ödem). Sekresyon evresi, korpus luteumda üretilen progesteron ve östrojen tarafından kontrol edilir.

4) Menstrual siklusun sonunda, korpus luteumun gerilemesine bağlı olarak kandaki steroid hormonların azalması, yaklaşık 1 gün süren bir iskemik evreyi başlatır. Normal kanlanmanın azalması, aralıklı iskemiye başlatır ve bunu izleyen hipoksi, endometriyumun fonksiyonel tabakasında nekroza neden olur. Nekroze doku, menstrual evrede dökülür. Gebelik olmuşsa, endometriyum lamina propriyasındaki stromal hücreler büyür ve artan progesteron düzeyine yanıt olarak lipid ve glikojen depolar. Bu endometriyal değişikliklere desidual reaksiyon denir. Çünkü endometriyumun fonksiyonel tabakası doğum sırasında desidua olarak dökülür (1, 2, 4, 18, 20).

Endometriyumun damarlanması farklıdır. Endometriyumu arkuat arterler kanlandırır. Arkuat arterlerin iki segmenti vardır:

1. Düz segment: Endometriyumun bazal tabakasını kanlandırır.
2. Kıvrımlı segment: Endometriyumun fonksiyonel tabakasını kanlandırır.

Kıvrımlı segment, endometriyumun kalınlığı arttıkça gerilir. Menstruasyondan hemen önce, düz segment ile kıvrımlı segmentin ayrıldığı noktadan başlayan ve kıvrımlı segmentte devam eden kontraksiyonlar, kan akımını azaltır ve endometriyumun fonksiyonel tabakasının dökülmesine neden olur (1, 2, 4, 18, 20).



Şekil 4: Dişi iç genital sisteminin organları

2.3. Ovaryal döngü ve Gamatogenez

Ovaryal siklus üç evreden oluşur:

- 1) Folliküler evre
- 2) Ovulatuvar evre
- 3) Luteal evre

Folliküler evrede, primordiyal follikülden olgun follikül (Graaf follikül) gelişir. Primordiyal follikül, en çok bulunan ve en küçük (25µm çapında) olan, yassı folliküler ya da granüloza hücreleri tarafından çevrilmiş folliküldür. Primordiyal folliküller, fetal ovaryumda geliştikten sonra bir dinlenme evresine (1.mayoz, profazın diploten) girer ve bu evrede bekler. Bekleme evresinden çıkan primordiyal folliküllere, primer folliküller denir ve bunlar iki tiptir:

- 1) Tek tabakalı primer folliküller: etrafında tek sıralı kübik folliküler hücreler bulunur.
- 2) Çok tabakalı primer folliküller: Çok katlı ve çoğalan kübik hücrelerle çevrilidir.

Foliküler hücreler, kendilerini ovaryumun stromasından ayıran bir bazal lamina tarafından desteklenir. Primer follikül evresinde, primer oosit zona pellusida denilen glikoprotein bir kılıf sentezlemeye başlar. Zona pellusida, folliküler hücreleri oositin ayırır. Folliküler hücrelerin ince sitoplazmik uzantıları zona pellusidayı deler ve oositin mikrovilluslarıyla temas eder. Temas noktalarında oluklu bağlantılar bulunur. Sonraki evre, sürekli bölünen follikül hücreleri ve kalınlaşan zona pellusida ile karakterize sekonder folliküldür. Follikülü çevreleyen stromal hücreler, teka denilen hücresel bir kapsül oluşturacak şekilde düzenlenir. Teka daha sonra iki tabakaya farklılaşır:

- 1) Teka interna (iç kılıf)
- 2) Teka eksterna (dış kılıf)

Gelişmekte olan follikülün bazal laminasına komşu, iyi damarlanmış teka interna tabakası, bir androjen prekürsörü olan androstenediyonu salgılar. Androstenediyon, testosteron üretimi için follikül hücrelerine taşınır. Daha sonra, testosteron, aromataz tarafından östradiyola çevrilir. Folliküler hücreler, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle, folliküler hücreler follikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler (1, 2, 4, 18, 20).

Teka eksterna, kapsül benzeri bağ dokusu bir tabakadır ve ovaryumun stroması ile devam eder. Folliküler hücreler arasında, hücreler arası boşluklar (Call-Exner cisimleri) görülür. Bu aralıklar folliküler sıvı içerir ve daha sonra birleşerek, daha büyük bir boşluk olan antrumu yapar. Antrumun oluşması, folliküler hücrelerin primer oosite göre yeniden düzenlenmesine neden olur. En büyük follikül, olgun folliküldür (Graaf follikülü / preovulatuvar follikül), 15-20 mm çapındadır. Ovulasyondan hemen önce, primer oosit, follikül içinde eksentrik bir konum alır (1, 2, 4, 18, 20).

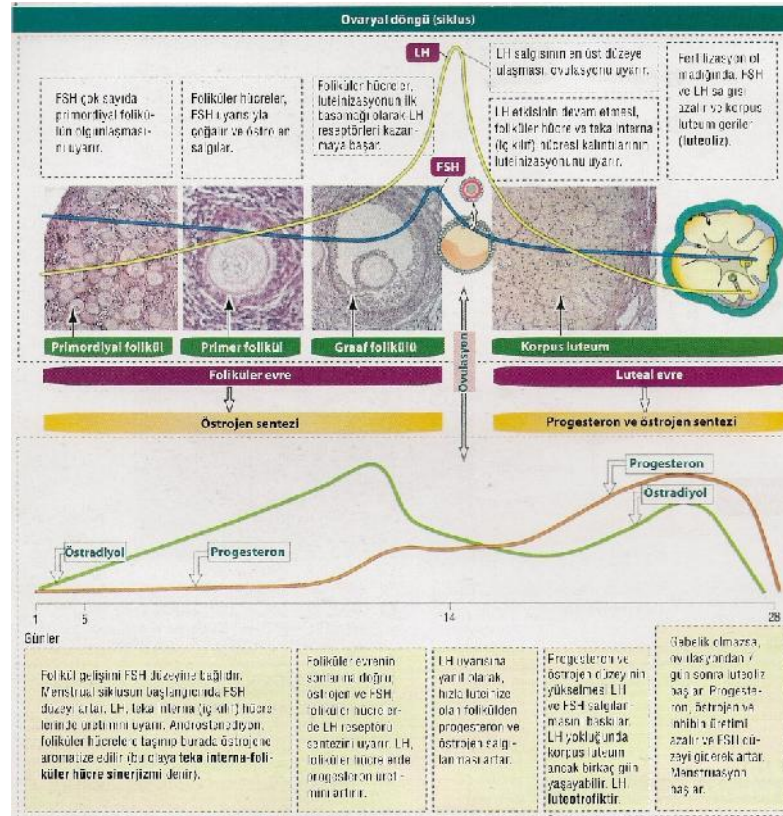
Primer oosit, zona pellusidaya sıkıca yapışmış ve korona radyata denilen tek sıralı folliküler hücrelerle çevrilidir. Olgun follikül ya da Graaf follikülü, şu özelliklerle karakterizedir:

- 1) Folliküler sıvı içeren büyük bir antruma sahiptir.
- 2) Korona radyatayı yapan tek sıralı folliküler hücrelerin çevrelediği zona pellusida bulunur.
- 3) Oosit ve ona bağlı olan korona radyata, kumulus ooforustan ayrılır; oosit-zona pellusida-korona radyata kompleksi follikül sıvısı içinde serbest olarak yüzer.

4) Ovulasyon birkaç saat önce I. mayoz tamamlanır ve sekonder oosit ve birinci kutup cismi oluşur. Birinci kutup cismi, perivitellin aralık denilen ve zona pellusida ile oosit arasındaki aralığa atılır.

5) Folliküler hücreler, sahip oldukları Follikül Stimülen Hormon (FSH) reseptörlerinin yanı sıra, Luteinizan Hormon (LH) reseptörleri de kazanır. Bu olay, korpus luteumun luteinizasyonu ya da gelişmesi için kritiktir (1, 2, 4, 18, 20).

Ovulasyon zamanında, olgun follikül ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru, stigma denilen bir çıkıntı yapar. LH düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albugina içindeki etkinlik ve proteolitik enzimler olgun graaf follikülünün yırtılmasını kolaylaştırır. Dışarıya atılan gamet, ovaryuma çok yaklaşmış olan tuba uterina (ovidukt) girer. Ovulasyondan birkaç saat önce, folliküler hücre tabakası ve teka interna, korpus luteuma dönüşmeye başlar (LH reseptörü ortaya çıkması) (Şekil 5) (1-4, 18).



Şekil 5: Ovaryumda gelişen değişik aşamalıdaki folliküller

Ovulasyondan sonra, geride kalan folliküler hücre tabakası büzüşür ve hormon salgılayan majör bir bez olan korpus luteumun bir parçası olur. Bu dönüşüm aşağıdaki evreleri izler:

1) Follikülün bazal membranı yıılır.

2) Başlangışta damarsız olan folliküler hücre kümesi içine kan damarları girer. Antrum boşluğuna kan dolar ve pıhtılaşır; böylece, geçici bir yapı olan korpus hemorajikum oluşur. Daha sonra, yeni oluşmuş kan damarları (anjyogenez), fibroblastlar ve kollajen lifler fibrin pıhtı içine girer.

3) Folliküler hücreler ve teka interna hücrelerinin değişimi söz konusu olur. Folliküler hücreler: folliküler lutein hücelere dönüşüp, tipik olarak steroid sentezleyen hücre özellikleri yani; lipit damlacıkları, gelişmiş Agran ler Endoplazmik Retikulum (AGER) ve tübüler kristali mitokondriyonlar, gösterir. Bu  zellikleri kazandıktan sonra, FSH ve LH uyarısına yanıt olarak progesteron ve östrojen salgırlar. Folliküler hücrelerde LH reseptörlerinin görülmeye başlaması, luteinizasyon evresi için kritik bir olaydır. Teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerine dönüşür ve LH uyarısına yanıt olarak androstenediyon ve progesteron üretir(1-4).

Folliküler lutein hücrelerinde;  stradiyol sentezinin tamamlanması için gerekli olan steroidojenik enzim yoktur. Teka lutein hücreleri, androstenediyon sağlayarak, folliküler hücrelerle işbirliği yapar. Androstenediyon daha sonra folliküler lutein hücrelerinde  strodiyole çevrilir. Korpus luteum büyümeye devam eder ve fertilizasyon olmamışsa, ovulasyondan yaklaşık 14 gün sonra gerileme evresine girer. Fertilizasyon olmuşsa, korpus luteum büyümeye devam eder ve progesteron ile östrojen üretmeyi sürdürür. Korpus luteumun yaşamasını sağlayan, implante embriyonun trofoblast hücrelerinde üretilen insan Koryonik Gonadotropininin (hCG) uyarıcı etkisidir.

Progesteron ve östrojen, gebeliğin yaklaşık 9.-10. haftalarına kadar endometriyumun beslenmesi için gereklidir. Bu süreçte; plasenta, f tal sürrenal korteksi ve karaciğer  strojenleri üretir (1, 2).

Luteoliz (Korpus luteumun gerilemesi) sonucunda, korpus albicans oluşur. Bu süreçte, korpus luteumun dejenere olan luteal hücre kümelerinin yerini stromal bağ dokusu alır. Korpus albicans ovaryumda kalır; küçülür ama hiçbir zaman kaybolmaz. Korpus luteumun gerilemesinden sonra, stromada serbest kalan luteal hücreler, salgılama etkinliklerini yeniden kazanabilir ve bu durumda interstisyel bezler adını alır. Bu tip interstisyel bez hücrelerine insan ovaryumunda sık rastlanmaz(1, 2).

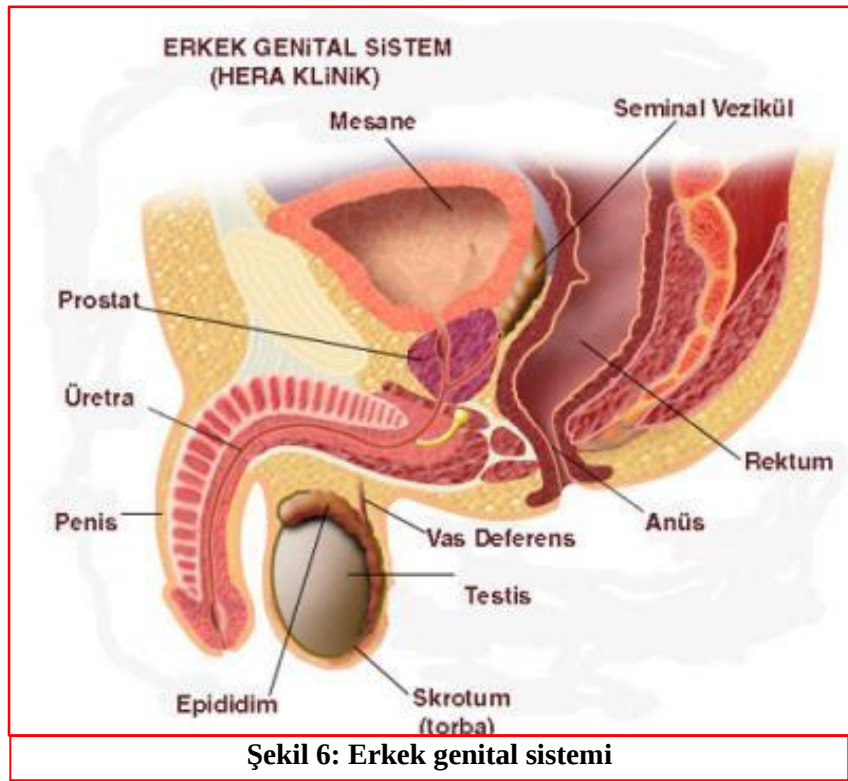
Çok sayıda primer follikül olgunlaşma sürecine başlar. Ancak, yalnızca bir follikül gelişimini tamamlar, diğerleri atrezi denilen bir olayla dejenere olur. Folliküller, gelişimlerinin herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilir. Atretik folliküller; camsı membran denilen kalın,

kıvrılmış membranöz materyal, çok değişikliğe uğramamış zona pellusida, dejenere olmuş oosit, follikül hücrelerinin kalıntıları ve istilâ eden makrofajlar ile ayırt edilir (1, 2).

2.4. Erkek Genital Sisteminin Anatomisi ve Histolojisi

Erkek üreme sistemi dış genital organlar, iç genital organlardan oluşur. Erkek üreme sisteminin organları aşağıdakilerden ibarettir:

- 1) Gonadlar (testis): Sperm üretimi ve androjenlerin salgılanması.
- 2) Genital boşaltım yolları: (Tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus, uretra) spermiumu dışarıya taşıyan kanallar.
- 3) Yardımcı bezler: (Vezikula seminalis, Prostat, Bulbouretral bezler) Salgıları semen kitlesini oluşturur.
- 4) Penis: erektile dokudan oluşan çiftleşme organı (Şekil 6)(18-21, 24).



Şekil 6: Erkek genital sistemi

Testisler 10-14 gr ağırlığında, 3cm kalınlığında, 2-3cm genişliğinde ve yaklaşık 4cm uzunluğundadır. Bir testisin iki yüzü (facies lateralis ve medialis), iki ucu (extremitas superior ve inferior) ve iki kenarı (margo anterior ve posterior) bulunur. Testis içerisinde yerleşik olarak bulunan tubuli rekti ve rete testis ile testis dışında yerleşik olarak bulunan duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus kanalları genital kanal sistemini oluşturur. Bu kanal

sistemi ve bununla ilişkili olan vesikula seminalis, prostat bezi, bulboüretal bezler ve cinsel birleşme organı olan penis erkek üreme sistemini oluşturur. Erken fetal dönemde, karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler, fetus geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce inguinal kanal aracılığı ile skrotuma inerler. Testislerin normal fonksiyonlarını yapabilmeleri için karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur. Testisin en dışında bulunan skrotum deri fibröz kılıf ve kas liflerinden oluşur. Skrotum içten dışa doğru; peritonun lamina periatealisi (periorchium), fascia spermatika interna, m. Cremaster, . Obliquus, fascia spermatika externa, m. Obliquus, tunika dartos ve en dışta cutis (deri) den oluşur. Ayrıca skrotum içerisinde testis, epididimis, duktus deferensin bir kısmı ve bu organlara gelen kan damarları ile sinirler bulunur (2, 18-21, 23).

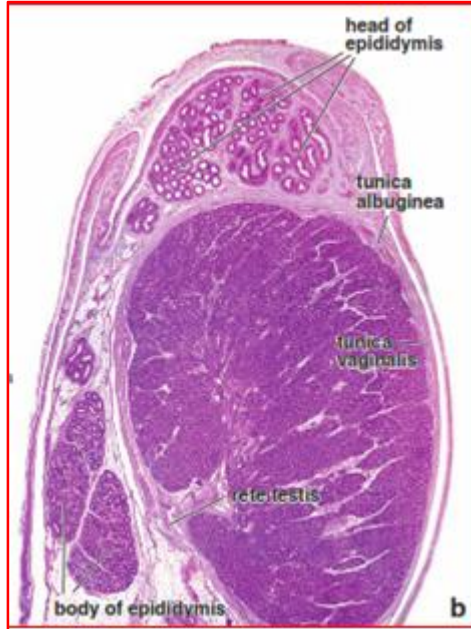
Testislerin karın boşluğunun dışında yerleşimi vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34-35°C gereklidir. Olgun testisin posteriyor yüzü epididimis ile ilişkilidir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vaza deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır. Testis ekzokrin ve endokrin fonksiyonlu bileşik tubuler bezdir. Ekzokrin salgısı canlı hücre spermilerdir. Salgılama biçimi aktif halokrindir. Endokrin salgısı leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron hormonudur. Testisler skrotum denen, deri ve fibromuskular yapıda bir kese içinde, funikulus spermatikus ile asılı durumdadır. Testis rete testisin yer aldığı yerde kalınlaşarak mediastinumu oluşturan tunika albuginea ile çevrelenir (18-21, 23).

Mediastinumda testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lopçuğa böler. Herbir lopçuk 1 ila 4 seminifer tübül içerir. Herbir seminifer tübül yaklaşık 150 mikrometre çapta ve 30-70cm uzunluktadır (Toplam 500m); iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelin ürünlerini (Testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır. Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelin ile döşeli merkezi bir lümeninden oluşur: Somatik sertoli hücreleri, Spermatogenik hücreler (spermatogonyum, spermatosit ve spermatidler). Seminifer epitel bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir. Miyoid hücreler hareketsiz spermeleri rete testise iletken ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur. Spermier epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar. Seminifer tübül arasındaki boşluk kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten Leydig hücre grupları tarafından doldurulmuştur. Her bir testis skrotumun altında, 3 tabakalı bir kapsül ile

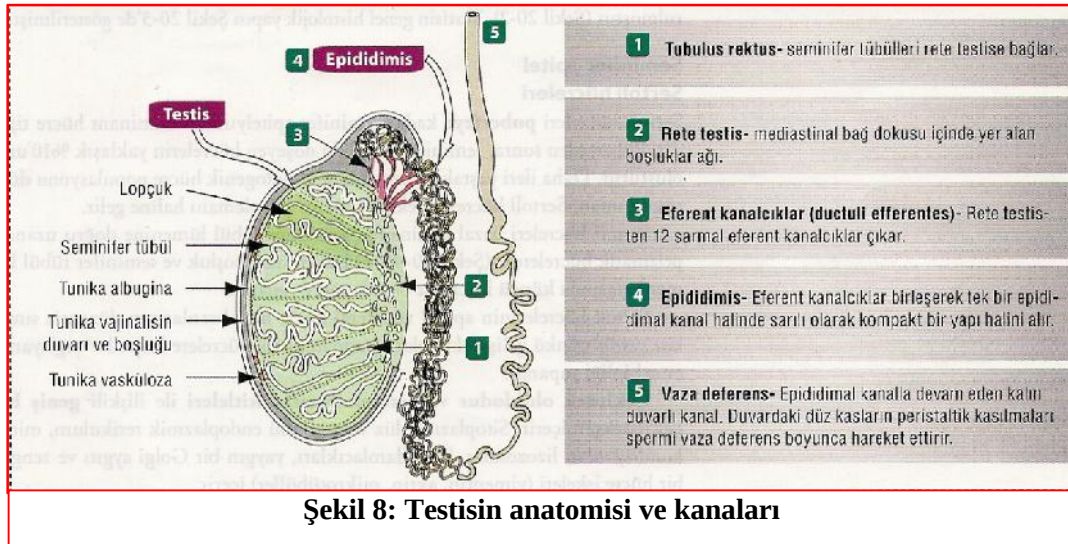
sarıldır. Bu yapıya testiküler kapsül denir ve tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza tabakalarından oluşur (18-21, 23).

Testis en dışta mezotelyal hücrelerden oluşan, 2 yapraklı, periton kökenli seröz bir kese olan tunika vaginalis tabakası ile örtülüdür. Tunika vaginalisin visseral yaprağı testisin ön ve yan yüzlerini çevreler, pariyetal yaprağı ise skrotum üzerinde uzanmaktadır. Bu tabakanın altında tunika vaginalisin visseral yaprağı olan ve tunika vaginalisten bazal lamina ile ayrılan, tunika albuginea tabakası bulunmaktadır. En içte bulunan tunika vasküloza tabakası ise gevşek bağ dokusundan oluşur ve kan damarlarını içermektedir. Tunika albuginea histolojik kesitlerde en belirgin gözlenen, düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan yoğun bir tabakadır. Bu tabaka testisin posterior yüzeyi boyunca üçgen şeklinde bir kalınlaşma meydana getirir ve mediastinum testis yapısını oluşturarak organın parankiması içerisine sokulur. Mediastinum testis yapısına, tıpkı hilum yapısına olduğu gibi, genital boşaltma kanalları, kan ve lenf damarları ve sinirler bağlanır. Buradan ışımsal olarak çıkan sıkı bağ dokusu yapısındaki, ince fibröz bölmeler (septula testis) testisi insanda yaklaşık olarak 250-300 lobüle ayırır. Piramit şeklindeki lobüllerin tavanları mediastium testise, tabanları ise testisin dış yüzüne bakar. Lobüllerin birbirleriyle ilişkide olmalarını sağlayan bölmelerin tam olmamasıdır. Seminifer tübüllerin arası tunika vaskülozanın testis içine uzanarak oluşturduğu interstisyel doku ile doldurulmuştur. Testis tübülleri mediastinum bölgesi yakınında sonlanır. Sonlanan tübüllerin lümenleri daralır, düzleşir ve tubuli rekti (tubulus seminiferi rekti) denilen bir testis içi boşaltım yolunu oluşturur. Bu yapı seminifer tübülleri dar kanallardan oluşan bir ağ yapısında olan rete testise bağlar. Rete testis mediastinum testis bölgesinde anastomozlaşmıştır. Tubuli rektinin rete testis ile ilişkili bölümü ve rete testis genelde tek bir silia içeren ve kısa mikrovilluslu kübik epitelle döşelidir, tubuli rektinin seminifer tübül ile ilişkili olan bölümünde ise sadece sertoli hücreleri yer alır. Kıvrımlı yapıya sahip olan duktuli efferentes kanalları birleşerek spermiyumların toplandığı ve depolandığı, en uzun, oldukça kıvrıntılı, katlantılı ve tek bir kanal olan duktus epididimisi oluştururlar. Duktus epididimisin epiteli; epitel hücrelerinin bir bazal lamina üzerine oturduğu, kısa bazal hücreler ile uzun sterosilyalı prizmatik hücrelerin yer aldığı sterosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epiteldir. Bazal laminanın altında ince bir lamina propria bulunur. Lamina propriasında altında ince düz kas katmanı yer alır. Duktus epididimisin kuyruk kısmından sonra kanal duvarı birden bire kalınlaşır ve düz bir kanala dönüşür. Bu kanala duktus deferens denir ve kanal duvarında kalın bir düz kas tabakasını içerir. Duktus deferens salgılama işlevine de sahip epiteli, sterosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epiteldir. Epitel

distalde ise değişici epiteldir. Duktus deferensin prostat bezine girmeden önceki kısmının genişlemesiyle ampulla bölgesi oluşur. Vezikula seminalis kanalları duktus deferense ampulla bölgesinden sonra katılırlar. Sonra duktus deferens prostat bezine girer ve duktus ejakulatoryus kanalını oluşturur. Sonrasında ise üretraya açılır (Şekil 7, 8) (18, 18).



Şekil 7: Testisin Histolojik Yapısı



Şekil 8: Testisin anatomisi ve kanalları

Kan-Testis Bariyeri; seminifer tübüller ile interstisyel kan damarları arasında yer alan ve seminifer tübüllere immünoglobülinlerin geçmesini önleyerek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasını sağlayan, sertoli hücrelerinin kurduğu sıkı bağlantılar ile oluşan bariyerdir (6, 19). Seksüel olgunlaşmanın immunolojik yeteneğın gelişmesinden sonra

meydana gelmesi sebebiyle spermatogenez sırasında ortaya çıkan birtakım proteinler farklılaşmakta olan sperm hücrelerinin yabancı olarak algılanmasına ve yok edilmesine sebep olabilecek bir immün yanıtı tetikledikleri için, kan-testis bariyeri gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek her türlü etkileşimi ortadan kaldırır (7,18).

2.5. Spermatogenik hücreler ve spermatogenez

Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinin büyük çoğunluğunu oluşturan çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan ve düzenli olarak bölünerek olgun spermlere farklanan, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde 4-8 tabakalı hücrelerdir. Lümeden bazale doğru farklılaşmanın ve olgunlaşmanın değişik evrelerindeki hücre tipleri sırası ile lümeden bazale doğru spermiumlar, spermatidler, sekonder spermatositler, primer spermatositler ve spermatogonyumlardır (1-7, 18, 20).

Spermatogonyumlar, sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında kaldığı için bazal kompartımanda yer alırlar. Bazal lamina ile ilişkidirler ve kan-testis bariyerinin dışında kalırlar. 2 farklı tipi bulunur (1, 2, 9).

Tip A spermatogonyumlar oval çekirdekli, yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli seminifer epitelin kök hücreleridir. Puberteden itibaren mitoz geçirirler ve soluk boyanan, oval çekirdekli, ince granüler kromatinli tip A açık spermatogonyumlar ile tip A koyu spermatogonyumları meydana getirirler. Tip A açık spermatogonyumlar mitoz geçirerek tip B spermatogonyumları oluştururlar.

Tip B spermatogonyumlar mitoz geçirerek primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler, DNA (deoksiribonükleik asit) sentezini tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz safhasının bütün fazlarını geçirirler. Profaz evresi yaklaşık 22 gün sürer ve çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığı ile karakterize edilen, spermatogenik serinin en büyük ve histolojik kesitlerde en çok karşılaşılan hücreleri primer spermatositlerdir. Profaz evresinden sonra kardeş kromatidler sırasıyla metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini geçirerek $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içeren sekonder spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler kısa süren bir interfaz evresi geçirdikleri ve hızla ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için histolojik kesitlerde çok zor görülürler (1-6, 18-21).

Sekonder spermatositler; ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak seminifer tübül lümeni yakınlarında sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerine yerleşmiş, 7-8 μm çapa,

yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan merkezi yerleşimli çekirdeğe, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksine, çok sayıda mitokondri ve bir çift sentriyole sahip olan spermatidleri oluştururlar. Spermatidler sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında spermiyogenez denilen ve sırasıyla golgi fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazı olmak üzere 3 aşamadan oluşan bir farklılaşma süreci geçirerek olgun spermiyum oluştururlar. Olgun spermiyum da spermiyasyon denilen olayla seminifer tübül lümenine salınır. Sonuç olarak ise bir spermatogonyumdan 4 olgun sperm oluşur (Şekil 9) (1-7).

İnsanlarda bir spermatogonyumdan olgun bir spermiyum spermatogenezis olayı ile yaklaşık olarak 64 günde meydana gelir. Olgun bir spermiyum baş, boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur. Baş bölgesinde yassı biçimli, yoğun kromatin içeren bir çekirdek ve çekirdeğin anterior yarısını örten, özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom bulunur. Akrozom hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir. Boyun bölgesi baş ile kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan dar bir parçadır. Sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemi oluşturan proksimal sentriol ile distal sentriol olmak üzere bir çift sentriol bulunur. Kuyruk bölgesi ise orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur. Kuyruğun orta parçası sarmal olarak dizilmiş mitokondriler, 9+2 mikrotübüler yapıdaki aksonem ve sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet dış yoğun fibrillerden oluşmuştur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır ve spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan yedi adet dış yoğun fibrille sarıllı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Kuyruğun en kısa parçası olan son parçada ise yalnızca aksonem bulunur, dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf bulunmaz (1, 2, 7).

İnsanlarda spermatogenezisin her seminifer tübülde eş zamanlı olarak gerçekleşmemesi ve bazı lümende serbest spermiyumlara rastlanırken bazılarında yalnızca spermatidlerin gözlenmesi seminifer tübüllerde düzensiz bir görünüme yol açar. Ratlarda ise her seminifer tübülde spermatogenezis eş zamanlı olarak gerçekleşir. Ayrıca spermatogenezis evrelerinin sayısı hayvan türlerine göre farklılıklar gösterir. İnsanlarda 6, farede 12, ratda 14 adet spermatogenezis evresi görülür (1-7, 18).

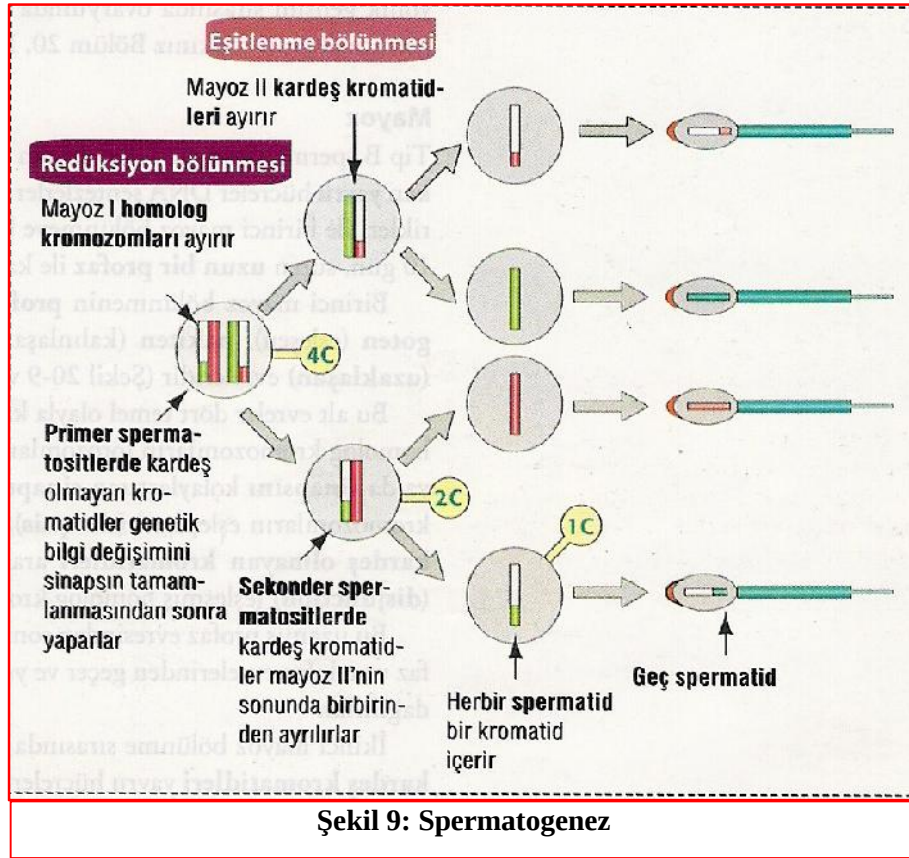
Spermatogenezis bir spermatogonyumdan olgun spermiyum oluşurken meydana gelen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım evrelerini içeren bir süreçtir ve 2 fazda gerçekleşir (Şekil 9) (7, 18).

Spermatidlerin bir dizi hücre farklılaşması süreci geçirerek spermiyumları oluşturdıkları bu evre spermiyogenezis olarak adlandırılır (7, 18).

Spermiyogenez Bu süreç spermiyogenez olarak adlandırılır ve 3 fazdan oluşur: Golgi Fazı, Akrozomal Faz, Matürasyon Fazı (1-7).

Oluşan spermiyumlar seminifer tübül lümenine doğru salınırlar ve geriye kalan artık sitoplâzma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatogonyumların bölünmesiyle ve sonraki aşamalarda oluşan hücrelerin tamamen ayrılmayıp birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı kalmaları, yaklaşık 70 gün sürer. Tek bir spermatogonyumdan oluşan primer ve sekonder spermatositlerle, spermatidler arasındaki iletişimin devamlılığını sağlar. Sertoli hücrelerinin apikal sitoplâzma katlantılarında spermiyogenezis aşamasını geçiren spermatid olgun spermiyuma dönüşür ve spermiyasyon olayıyla seminifer tübül lümenine salınır(1-7).

Testiküler spermiler hareketsizdir; ovumu fertilize edemez. Spermatozoa bu yeteneği ancak epididimden geçerken kazanır. Spermilerin epididimden geçiş süresi yaklaşık 2 gündür. Rete testis sıvısıyla duktus deferense gelen spermiler, bu hücrelerin su reabsorbe etmesiyle oluşan basınç farkı, epitel hücrelerinin siliyer hareketleri ve en önemlisi de miyoid hücrelerin kasılması ile taşınır. Sperm, epididim içinde ilerledikçe motilite kazanır. Epididim fonksiyonu, androjene özellikle dihidrotestosterona bağlıdır. Epididim kanalındaki epitel hücrelerinden salgılanan maddelerin tümü sperm olgunlaşmasında etkilidir. Duktus deferens spontan motiliteye sahip bir organdır. Düzensiz küçük kasılmalarla sürekli sperm taşır. Cinsel uyarılarla bu taşıma hızlanır(1-7).



2.6. Fertilizasyon

Çiftlerin ortalama %15'i infertilite problemiyle karşılaşmaktadır. Bu çiftlerde, %50 oranında kadın faktörü, %40 oranında primer erkek faktörü ve %10-15 oranında açıklanamayan infertilite söz konusudur (25-28). YÜT'den biri olan IVF uygulamaları; ilk olarak tamir edilemeyen tubal hasarı olan çiftlere yardımcı olmak adına geliştirilmiş ise de günümüzde pek çok endikasyon için kullanılmaktadır. IVF, laboratuvar koşullarında overlerden toplanıp, spermle fertilize edilen oositten oluşan embriyonun uterus içerisine yerleştirildiği bir tekniktir. IVF endikasyonları olarak, tubal faktör, endometriozis, erkek faktörü, açıklanamayan infertilite ve immünolojik infertilite sıralanabilir (6, 29, 30-).

Fertilizasyon öncesi 2 olay meydana gelir:

1. Epididimislerde sperm maturasyonu
2. Dişi üreme kanallarında sperm kapasitasyonu.

Testisten salınan ve epididim kanalına giren sperm sirküler harekete sahiptir. Sperm, epididimise geçip ve epididimisin kuyruk veya kuyruğa yakın bölgesinde depolanmayı içeren 2 haftalık olgunlaşma sürecinden sonra fertilizasyon için gerekli olan ileri hareketini kazanır.

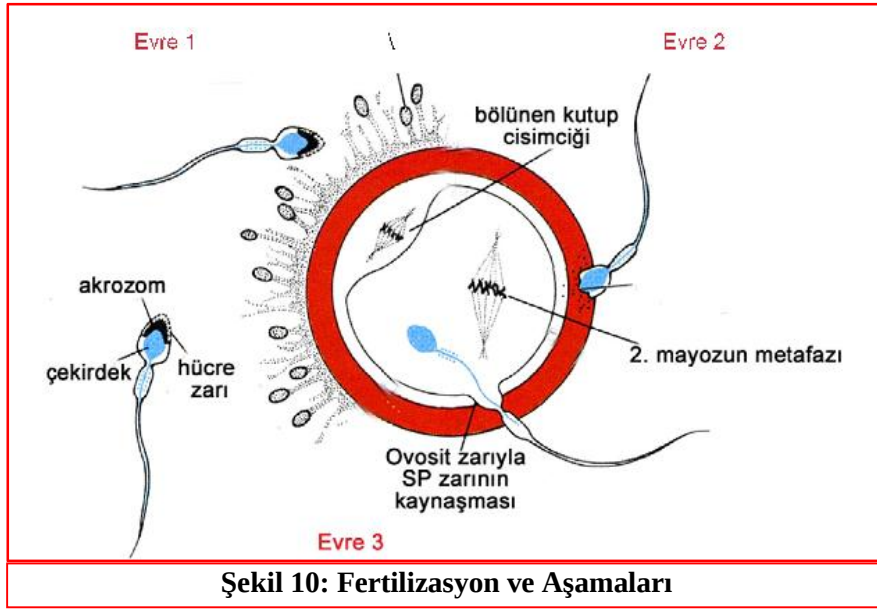
Ejakulasyondan sonra, sperm uterusu kapasitasyon sürecine girer ve tuba uterina kanalında bulunan ovumun fertilizasyonunu gerçekleştirir(1-7, 23).

Esasen fertilizasyon yeteneğine sahip sperm hem maturasyon hem de kapasitasyon süreçlerini sperm-oosit füzyonun öncesi tamamlamalıdır. Kapasitasyon in vitro koşullarda preinkübasyon olarak hazırlanır. (1-7, 18, 23).

Fertilizasyon sırasında 3 ana olay meydana gelir. Bunlar sırasıyla (Şekil 10):Akrozom reaksiyonu, zona pellusidanın bir glikoproteini olan ZP3'e spermin bağlanması ve sperm-oosit füzyonu dur.

Oosite yaklaştığında ve Ca^{++} varlığında spermin plazma membranı dış akrozomal membranla kaynaşır. Bu olay akrozom reaksiyonu olarak adlandırılır. Membran füzyonuyla oluşan küçük açıklıklar hidrolitik enzimlerin salınımını kolaylaştırır. Akrozomun ekvatoryal bölgesi membranların kaynaşması sürecine katılmaz. Özet olarak fertilizasyon (1-7, 18, 23).

1. Korona radiata (1.bariyer): Sperm kuyruğunun hareket ve hyaluronidaz enzimi.
2. Zona pellusida (2.bariyer): Sperm ZP₃ reseptörüne bağlanır, intrasellüler iyon ve PH'nin yükselmesi ile akrozom enzimlerinin salınmasına neden olur; ZP ile bileşir ve yapısını değiştirir.
3. Oosit membranı (3.bariyer): Birleşme sonrası sperm oosit membranını geçer ve oosit membranı depolarize olur. Ca^{++} hücre içinde çoğalır ve kortikal reaksiyon gerçekleşir. Reseptörlerin hidrolizi zona pellusidanın düzenlenmesinin değişimine neden olur.
4. Fertilizasyon devamında, mayoz II (metafaz II) tamamlanır. DNA sentezi ve her iki pronukleusun kılıf kaybı olur, kromozomlar karışır ve zigot (46 kromozom.) oluşur(24). Bu olay yarıklanmayı başlatır (Şekil 10).



2.7. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi tekniği

1902'de "The Electrochemical Society" kuruldu (15, 16). Taramalı prob teknolojisini, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) temel prensipleriyle birleştirerek uzamsal olarak çözünmüş empedans ölçümlerinin alınmasını sağlar. Çalışma elektrodu numunesine sinüs eğrisi şeklinde küçük bir gerilim ya da akım sarsımı uygulanması ve sonuçta oluşan akımın empedans hesaplaması için ölçülmesi gibi geleneksel empedans spektroskopisi (EIS) prensipleriyle benzer bir prensipte çalışır. Fakat, akımı ölçmektense, küçük bir elektrokimyasal prob, elektrolitteki lokal akımı ölçecek şekilde yüzeye yakın olarak tarama yapar (31-39).

EIS 300 (Şekil 11) Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Teknikleri yazılımı ile 10 μHz ile 1 MHz frekans aralığında empedans ölçümlerini yapabiliriz. 2 milli Ohm'dan 10 tera Ohm (10^{12} Ohm)'a kadar olan Empedans ölçümleriniz için araştırma tabanlı Gamry'nin 4 modelinden birini kullanabiliriz. Geleneksel empedans sistemlerindeki cihazların kapladığı büyük hacim/alan, yüksek empedans değerlerinin ölçümünde sınırlamalar ve yüksek maliyet gibi çoğu dezavantajların üstesinden gelinmiştir. EIS 300 yazılımı ile Potansiyostatik EIS, Galvanostatik EIS, Hibrid Galvanostatik EIS ve Mott-Schottky eğrileri gibi dört farklı empedans deneyini gerçekleştirebiliriz. EIS uygulamaları kaplama, yakıt hücresi karakterizasyonu, pil testleri, korozyon hızı belirleme, mekanik ve kinetik çalışmalar ile daha fazlasını içerir. Sahip olduğu detaylı "Eşdeğer Devre Model Düzenleyicisi" ve "Eğri Eşleştirme (Fitting)" özelliği ile deney düzeniğinin elektriksel olarak ifadesi için ekstra bir yazılım ihtiyacı bulunmamaktadır. Ayrıca ölçüm yapmadan önce seçilen eşdeğer devre modelleri üzerinde,

girilen frekans aralıklarında ve devre elemanı değerlerinde Empedans grafiklerinin simulasyonunu yapılabilmektedir (39- 50).



Şekil 11: EIS 300 sistemi

2.8. EIS İle Standart Deneyler:

2.8.1. Potansiyostatik EIS

Geniş frekans aralığında empedans spektrumu elde eder. Elektrokimyasal hücrede hem 2 hem de 3 elektrot sistemi ile çalışılabilir. Kullanıcı AC potansiyelini, DC Ofset potansiyelini, başlama ve bitiş frekanslarını ve ölçülmüş veri noktalarının sayısını kontrol edebilir (41).

2.8.2. Galvanostatik EIS:

Geniş frekans aralığında empedans spektrumu elde eder. Elektrokimyasal hücre galvanostatik kontrol altındadır. Galvanostatik EIS açık devre potansiyelinin sürekli kaydı pıl ve korozyon testlerinde kullanışlıdır. Potansiyel değerleri düşük empedanslı pillerde çok küçük olduğu ve potansiyel çok yüksek çözünürlüklerde ölçülebildiği için bu özellik piller için önemlidir (41).

2.8.3. Hibrid Galvanostatik EIS:

Galvanostatik EIS'in bir formudur. Potansiyel değeri frekans aralığı boyunca kullanılan galvanostatik modda uygulanacak olan akımı belirlemek için hücreye uygulanan ilk potansiyelin verilerini kullanır. Alınan empedans değerleri istenilen potansiyele ulaşmak için AC akımını ayarlama kullanılır. Bu frekans aralığı boyunca oluşabilecek yüksek veya düşük potansiyeli engeller (41).

2.8.4. Çoklanmış Potansiyostatik EIS:

ECM8 Multiplexer aracılığıyla empedans taraması yapar. Verimliliği artıran bu özellik, kullanıcının tek bir cihazla 8 örneğe kadar çalışabilmesini sağlar (41).

2.8.5. Mott-Schottky:

Hücrenin empedansı DC offset potansiyeli aralığında tek bir test frekansı kullanılarak ölçülür. Hücre direnci ve kapasitans değeri (basit paralel RC modeli varsayılarak) DC voltajın bir fonksiyonu olarak gerçek zamanlı çizilir. Bu teknik genel olarak yarı-iletken ve ince tabaka formasyon çalışmalarında kullanılır(41).

2.9. Ratın Genital Sistemi:

Ratların üretilmesi büyük oranda farelerinkine benzer. Bununla birlikte, dişi ratlarda erkek feromonlarına bağlı olarak östrus döngüsünün senkronizasyonuna rastlanmaz. Östrus ve gebeliğin senkronizasyonu, 4 günlük bir progesteron uygulanması sonucu oluşan anöstrusu müteakip, FSH ve PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin; gebe kısır serum gonadotrofini) veya eCG enjeksiyonu ile sağlanır. Östrus döngüsü günün aydınlık periyodunun uzayıp kısalmamasından etkilenir. Günlük 12-16 saatlik bir ışık periyodu ile yapılan rat yetiştiriciliğinin başarı şansı en yüksektir. Sürekli ışığa maruz bırakılan (üç gün gibi kısa bir süre olsa bile) ratların üreme fonksiyonlarında ciddi problemler oluşur (51-56).

Çiftleşmeyi takip eden 12-24 saat içerisinde, vaginada bir tıkaç meydana gelir. Bu plağın vaginada veya kafesin herhangi bir yerinde görülmesi, cinsel birleşme zamanı hakkında bilgi verebilir. Rat üretim sistemleri farelerinkine benzer. Doğum sonrası östrus devresinde çiftleşme olursa, döllenmiş yumurtanın (zigot) uterus duvarına yapışma süreci; dolayısıyla, gebelik süresi birkaç gün uzar (57).

Döngü 4 günlük ise 2 günü diöstrustur (diöstrüs 1 ve 2), 5 günlük ise 3 günü diöstrüs olarak geçer (56-59).

Vasektomi olmuş erkeklerle çiftleşen proöstrus evesindeki dişi yalancı gebelik olarak adlandırılır(60-80). Yalancı gebelik için dişi, proöstrus (PE) evresinde hazırlanır. Süperovulasyon için ise östrüs (E) döneminde hazırlanır(57-61, 78).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Bu araştırma Doktora tezi kapsamında 2010'den itibaren 2013'ye kadar, Dokuz Eylül Üniversitesi'nin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ayrıca Deney Hayvanları Anabilim Dalı imkânlarından yararlanılarak yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme /çalışma grupları:

Mayıs 2011 yılında Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde deneysel IVF laboratuvarı alt yapısı hazırlanmaya başlandı. Haziran 2012'de kullanıma hazır hale geldi ve hemen proje başlatıldı. Önce proje için gerekli mikroçipler hazırlandı ve deneyler başlatıldı. Toplam 55 adet 8-16 haftalık 220 -250.gr ağırlığında Wistar Albino suşu Rat Dokuz Eylül Üniversitesi'nin Deney Hayvanları Anabilim Dalından temin edildi. Projenin önceden planına göre 15 adet erkek ve 40 adet dişi alındı. Özet olarak gruplar tabloda gösterilmiştir:

3.4. Yöntemin ve Grupların Şema ile Gösterilmesi:

3.4.1. Yöntemlerin şeması

Aşağıdaki tabloda (Tablo 1) çalışmadaki kullanılan yöntemler işlem sırasına göre gösterilmiştir:

Tablo 1: Yöntemlerin çalışma özeti		
Sıra	İşlem	Amaç
1	Mikroçip hazırlaması	EIS ölçümü için oosit çapına uygun çip hazırlandı
2	Vasektomi	Deneyden 10 gün öncesi kısır erkek hazırlandı
3	Süperovulasyon	Oosit toplama için östrus evresinde olan dişiye uygulandı. Süperovulasyon için eCG ve hCG hormonu kullanıldı
4	MESA	OPU günü sabah mikro cerrahi ile sperm aspire edildi ve spermeler hazırlandı.
5	Oosit toplama ¹ (OPU)	12-16 saat hCG enjeksiyonu sonrası oosit toplandı.
6	EIS(-)	Oositlerin yarısına EIS ile değerlendirmeden ICSI ya da IVF uygulandı.
7	EIS(+)	Oositlerin diğer yarısı EIS ile değerlendirilip, ICSI ya da IVF uygulandı.
8	Yalancı gebelik rat hazırlaması	Vasektomi olan erkekle embriyo transferinden bir gece öncesi çiftleştirilen pro österus evresinde olan dişiye denir.
9	Embriyo Transferi	Yalancı gebe ratlara toplam 4-14 arasında embriyo transfer edildi.
10	Alıcı annenin doğumunu beklemek	17-18 gün sonra doğum gerçekleşti
11	Data değerlendirilmesi	1. Fertilizasyon, embriyo transfer ve doğum oranı hesaplandı. 2. EIS Potansiyel Penceresi hesaplandı.

¹ OPU: Oocyte Pick- Up

3.4.2. Grupların şeması

Aşağıdaki tabloda (Tablo 2) özet olarak gruplar açıklanmıştır:

Tablo 2: Grupların çalışma özeti

8-16 Haftalık Wistar Albino Rat 55 adet Erkek= 15 Dişi = 40	Grup A Erkek grubu 15 adet	A1: Kontrol grubu	5 Ad	Normal koşullarda beslenip, MESA ile elde edilen spermier normal YÜT'leri için kullanıldı (EIS olmayan).				
		A2: Vasektomi grubu	5 Ad	Deneyden 10 gün önce vasektomi edildiler.				
		A3:Sperm aspirasyon grubu	5 Ad	Toplanan spermier rutin olarak hazırlandı ve YÜT'leri için kullanıldı (EIS ile uygulananlar).				
	Grup B Dişi grubu 40 adet	B1: Kontrol grubu	10 Ad	Normal koşullarda beslenip, oositleri toplandı.				
		B2: Yalancı gebelik grubu ²	20 Ad	B2.1 grup	10 Ad.	B2.1,1 grubu 5 adet EIS+	5 Ad.	EIS yöntemi ile incelenen oosit + Normal sperm IVF olduktan sonra embriyo transfer edilecektir.
						B2.1,2 grubu 5 adet EIS-	5Ad.	EIS yöntemi ile incelenmeyen oosit + Normal sperm IVF olduktan sonra embriyo transfer edilecektir.
				B2.2 grup	10 Ad.	B2.2,1 grubu 5 adet EIS+	5 Ad.	EIS yöntemi ile incelenen oosit + Normal sperm ICSI olduktan sonra embriyo transfer edilecektir.
						B2.2,2 grubu 5 adet EIS-	5Ad.	EIS yöntemi ile incelenmeyen oosit + Normal sperm ICSI olduktan sonra embriyo transfer edilecektir.
B3:Oosit toplanan grubu	10 Ad	Toplanan oositler B2'ye göre 4 gruba ayrıldılar.						

3.4.3. Grupların açıklaması:

15 adet erkek ve 40 adet dişi olmak üzere toplam 55 adet 8-16 haftalık 220 -250.gr ağırlığında Wistar Albino suşu rat (Rat) Dokuz Eylül Üniversitesi'nin Deney Hayvanları Anabilim Dalından temin edildi.

² .Yalancı gebelik grubu (Pseudo pregnancy group): vasektomi olan erkek grubu pro-österus dişilerle bir gece aynı kafeste bırakılır. Çiftleşen dişiler, yalancı gebelik grubu olarak adlandırılır (80 - 83).

Erkek grubu A ve dişi grubu B olarak adlandırıldı ve her iki grup alt gruplara ayrıldılar:

1- Erkek grubu (A) 3 alt gruba ayrıldı:

- Kontrol grubu (A₁):5 adet: MESA ile sperm temin edildi, EIS uygulanmayan oositlerle işleme alındı.
- Vasektomi grubu (A₂): 5 adet. Tüm erkekler deneyden 10 gün önce vasektomi oldular ve kısırlık testi yapıldı.
- Sperm aspirasyon grubu (A₃): 5 adet. MESA ile sperm temin edildi, EIS uygulanan oositlerle işleme alındı.

2- B grubu 40 adet dişi rat 3 alt gruba ayrıldılar.

- Kontrol grubu (B₁) 10 Adet: EIS uygulanmayan oositler bu gruptan temin edildi.
- Yalancı gebelik grubu (B₂) 20 Adet: Vasektomi olan erkek grubu ve pro-östrus evresinde olan dişi grubu bir gece aynı kafeste bırakıldı. Çiftleşen dişiler, yalancı gebelik grubu olarak isimlendirildi. Bu grup 4 alt gruba ayrıldı ve her dişinin uterusuna 4-14 adet embriyo transfer edildi:

- ✓ B_{2.1.1} (IVF +/- EIS+):EIS yöntemi ile incelenen oosit ile normal sperm IVF sonrası daha önceden yalancı gebelik olarak hazırlanan ratların uterusuna 4-14 adet embriyo transfer edildi.
- ✓ B_{2.1.2} (IVF +/- EIS -): EIS yöntemi ile incelenmeyen oosit ile normal sperm IVF sonrası daha önceden yalancı gebelik olarak hazırlanan ratların uterusuna 4-14 adet embriyo transfer edildi.
- ✓ B_{2.2.1} (ICSI +/- EIS+): EIS yöntemi ile incelenen oosit ile normal sperm ICSI sonrası daha önceden yalancı gebelik olarak hazırlanan ratların uterusuna 4-14 adet embriyo transfer edildi.
- ✓ B_{2.2.2} (ICSI +/- EIS-): EIS yöntemi ile incelenmeyen oosit ile normal sperm ICSI sonrası daha önceden yalancı gebelik olarak hazırlanan ratların uterusuna 4-14 adet embriyo transfer edildi.

- Oosit toplanan grup (B₃): 10 adet. EIS uygulanan oositler bu gruptan temin edildi

“EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) metodunu kullanarak ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması‘ başlığına dayanarak ICSI gruplarının sonucu tezde değerlendirilmiştir. IVF’den alınan sonuçlar daha sonra değerlendirilecektir.

3.4.5. Çalışma materyali:

Bu araştırmada yukarıda açıklandığı gibi toplanan oositler ikiye ayrılıp ve bir grup EIS yöntemiyle değerlendirildi. Diğer grup günümüzdeki rutin YÜT kriterlerine göre olgun olup olmadığı tespit edildi. Oositler işlem sonrası B₂ alt gruplarına transfer edildi.

Tüm hayvanlar numaralandırıldılar. Tablo 3, 4 ve 5’de ratların numarası, yapıldığı işlem, teslim tarihi ve sayısı açıklanmıştır:

3.4.6. Erkek Grubunun çalışma özeti

Aşağıdaki tabloda (Tablo 3) erkeğin alım tarihi, işlemin adı ve zamanı ve sonu kısaca gösterilmiştir.

Tablo 3: Erkek grubunun çalışma özeti							
Sıra	Grup	Teslim tarihi	İşlem	İşlem Tarihi	Dişi No.	Rat sonu	Açıklama
E ₁ ³	A ₂	03.09.2012	Vasektomi	04.09.2012	----	Oldu	FAZLA KETAMİN
E ₂	A ₂	03.09.2012	Vasektomi	05.09.2012	D ₃ + D ₁₅ + D ₂₇	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₃	A ₂	03.09.2012	Vasektomi	08.09.2012	D ₅ + D ₉ + D ₂₈	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₄	A ₁ , A ₃	03.09.2012	MESA	19.09.2012 07.10.2012 18.11.2012	D ₁ D ₄ D ₇	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₅	A ₁ , A ₃	03.09.2012	MESA	27.09.2012 07.10.2012	D ₂ D ₆	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₆	A ₂	02.10.2012	Vasektomi	03.10.2012	D ₁₀ + D ₈ + D ₂₁	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₇	A ₂	02.10.2012	Vasektomi	14.12.2012	D ₁₂ + D ₁₇ + D ₂₄	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₈	A ₁ , A ₃	02.10.2012	MESA	23.01.2013 01.02.2013	D ₁₁ D ₁₆	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₉	A ₁ , A ₃	02.10.2012	MESA	24.01.2013 28.01.2013	D ₁₄ D ₁₃	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₁₀	A ₂	02.10.2012	Vasektomi	10.10.2012	D ₂₀ + D ₁₉ + D ₃₀	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₁₁	A ₂	14.01.2013	Vasektomi	04.02.2013	D ₃₂ + D ₃₃ + D ₃₉	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₁₂	A ₁ , A ₃	14.01.2013	MESA	01.02.2013 07.02.2013 27.02.2013 05.03.2013	D ₁₆ D ₂₄ D ₃₅ D ₂₆	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₁₃	A ₂	14.01.2013	Vasektomi	10.02.2013	D ₃₆ + D ₃₈	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₁₄	A ₁ , A ₃	14.01.2013	MESA	09.02.2013 11.02.2013 15.02.2013 09.03.2013	D ₂₃ D ₂₉ D ₂₂ D ₃₇	Pilot	Deney Hayvanları AD
E ₁₅	A ₁ , A ₃	14.01.2013	MESA	06.02.2013 16.02.2013 07.03.2013	D ₁₈ D ₃₅ D ₄₀	Pilot	Deney Hayvanları AD

³ E₁: Erkek Numara 1 ve...

3.4.7. Dişi grubunun çalışma özeti

Dişi grubunu çalışma özeti Tablo 4 ve 5’de sunulmuştur:

Tablo 4: Dişi grubunun D1 – D20 çalışma özeti

Sıra	Grup	Teslim tarihi	İşlem	İşlem Tarihi	Donor ya Alıcı	İşlem sonucu	Rat sonu	Açıklama
D ₁ ⁴	B ₃	03.09.2012	Süperovulasyon	16.09.2012	D ₃	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₂	B ₃	03.09.2012	Süperovulasyon	24.09.2012	D ₅	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₃	B _{2,1,2}	03.09.2012	Yalancı gebe	21.09.2012	D ₃	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₄	B ₃	03.09.2012	Süperovulasyon	04.10.2012	D ₉	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₅	B _{2,2,2}	03.09.2012	Yalancı gebe	30.09.2012	D ₂	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₆	B ₃	02.10.2012	Süperovulasyon	14.10.2012	D ₁₀	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₇	B ₃	02.10.2012	Süperovulasyon	15.11.2012	D ₈	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₈	B _{2,2,2}	02.10.2012	Yalancı gebe	21.11.2012	D ₇	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₉	B _{2,2,2}	02.10.2012	Yalancı gebe	10.10.2012	D ₄	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₁₀	B _{2,2,2}	02.10.2012	Yalancı gebe	20.10.2012	D ₆	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₁₁	B ₃	14.01.2013	Süperovulasyon	20.01.2013	D ₁₅	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₁₂	B _{2,2,1}	14.01.2013	Yalancı gebe	26.01.2013	D ₁₄	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₁₃	B ₃	14.01.2013	Süperovulasyon	25.01.2013	D ₂₀	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₁₄	B ₃	14.01.2013	Süperovulasyon	21.01.2013	D ₁₂	Oosit toplama	Dekapite	-
D ₁₅	B _{2,2,1}	14.01.2013	Yalancı gebe	25.01.2013	D ₁₁	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₁₆	B ₃	28.01.2013	Süperovulasyon	03.02.2013	D ₁₇	Oosit toplama	Dekapite	
D ₁₇	B _{2,1,1}	28.01.2013	Yalancı gebe	03.02.2013	D ₁₆	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₁₈	B ₃	28.01.2013	Süperovulasyon	03.02.2013	D ₂₁	Oosit toplama	Dekapite	
D ₁₉	B _{2,2,1}	28.01.2013	Yalancı gebe	10.02.2013	D ₂₃	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₂₀	B _{2,2,1}	28.01.2013	Yalancı gebe	30.01.2013	D ₁₃	Gebe kaldı	Pilot	Deney Hayvanları AD

⁴D₁: Dişi 1 ve...

Tablo 5: Dişi grubunun D21 – D40 çalışma özeti

Sıra	Grup	Teslim tarihi	İşlem	İşlem Tarihi	Donor ya Alıcı	İşlem sonucu	Rat sonu	Açıklama
D ₂₁	B _{2,1,1}	31.01.2013	Yalancı gebe	08.02.2013	D ₁₈	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₂₂	B ₃	31.01.2013	Süperovulasyon	12.02.2013	D ₂₇	OPU	Dekapite	-
D ₂₃	B ₃	31.01.2013	Süperovulasyon	06.02.2013	D ₁₉	OPU	Dekapite	-
D ₂₄	B ₃	31.01.2013	Süperovulasyon	04.02.2013	D ₂₅	OPU	Dekapite	-
D ₂₅	B _{2,1,1}	31.01.2013	Yalancı gebe	09.02.2013	D ₂₄	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₂₆	B ₃	01.02.2013	Süperovulasyon	02.03.2013	D ₃₉	OPU	Dekapite	-
D ₂₇	B _{2,2,2}	01.02.2013	Yalancı gebe	17.02.2013	D ₂₂	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₂₈	B _{2,2,1}	01.02.2013	Yalancı gebe	18.02.2013	D ₃₅	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₂₉	B ₃	01.02.2013	Süperovulasyon	09.02.2013	D ₃₃	OPU	Dekapite	-
D ₃₀	B _{2,1,1}	01.02.2013	Yalancı gebe	01.03.2013	D ₃₁	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₃₁	B ₃	08.02.2013	Süperovulasyon	24.02.2013	D ₃₀	OPU	Dekapite	-
D ₃₂	B _{2,1,1}	08.02.2013	Yalancı gebe	23.02.2013	D ₃₄	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₃₃	B _{2,1,2}	08.02.2013	Yalancı gebe	15.02.2013	D ₂₉	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₃₄	B ₃	08.02.2013	Süperovulasyon	18.02.2013	D ₃₂	OPU	Dekapite	-
D ₃₅	B ₃	08.02.2013	Süperovulasyon	13.02.2013	D ₂₈	OPU	Dekapite	-
D ₃₆	B _{2,1,2}	28.02.2013	Yalancı gebe	06.03.2013	D ₄₀	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₃₇	B ₃	28.02.2013	Yalancı gebe	06.03.2013	D ₃₈	OPU	Dekapite	-
D ₃₈	B _{2,1,2}	28.02.2013	Yalancı gebe	08.03.2013	D ₃₈	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₃₉	B _{2,1,2}	28.02.2013	Yalancı gebe	04.03.2013	D ₂₆	Gebe	Pilot	Deney Hayvanları AD
D ₄₀	B ₃	28.02.2013	Yalancı gebe	04.03.2013	D ₃₆	OPU	Dekapite	-

3.5. Deneyin Aşamaları

Projenin akışına göre ilgili yöntemler çalışmada uygulandı.

3.5.1. Mikroçip hazırlaması

Tezin materyal metoduna dayanarak, oosit ve spermin EIS ölçümü için mikroçip yapıldı ve denendi.

3.5.1.1. Oosite uygun mikroçip hazırlanması

İlk başta farklı kalınlıkta plastik cam (Plexiglass) denemelerinden sonra 6 mm kalınlığındaki plastik cam uygun bulundu. Oosit mikroçipin hazırlanması için önce farklı matkap uçlarıyla (0.5,1.0,1.2, 1.50, 2.00,2.50 mm) 5mm derinliğinde bir kuyucuk kazılıp, sonra 0,3 mm matkap ucuyla, 300 µm çapında ve 1 mm uzunluğunda bir silindir şeklinde kanal açıldı. Bu parçanın arkasında bir oluk kazılıp, farklı mikroçiplerden birisinde 50 µm çapında platin-iridyum teli, diğerinde 120 µm çapında bakır teli ve üçüncü bir plexi glass'te 230 µm çapında gümüş teli yerleştirildi. Sonunda gümüş tel uygun bulundu. Tüm bu parçaları bir lam üzerine monte edildi (Şekil 12-17) (77).



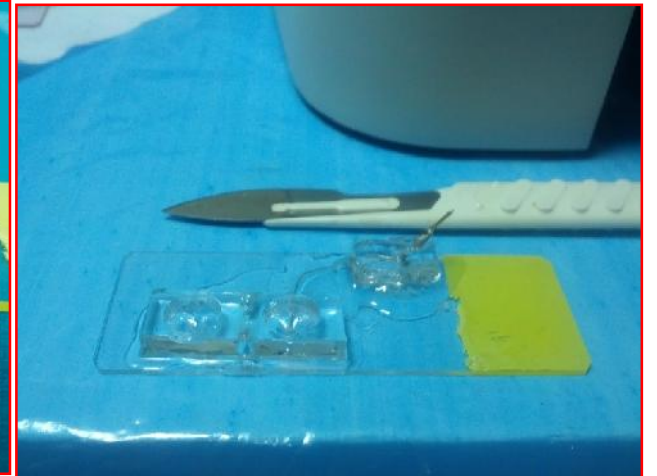
Şekil 12: EIS için hazırlanan farklı oosit mikroçipler



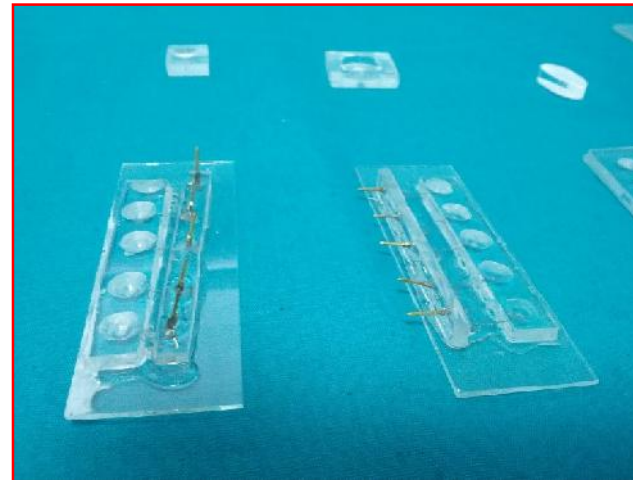
Şekil 13: EIS için hazırlanan farklı oosit mikroçipler



Şekil 14: EIS için hazırladığımız tek haneli oosit mikroçipi



Şekil 15: EIS için hazırladığımız tek haneli oosit mikroçipi



Şekil 16: EIS ölçümü için 5 haneli oosit mikroçipi

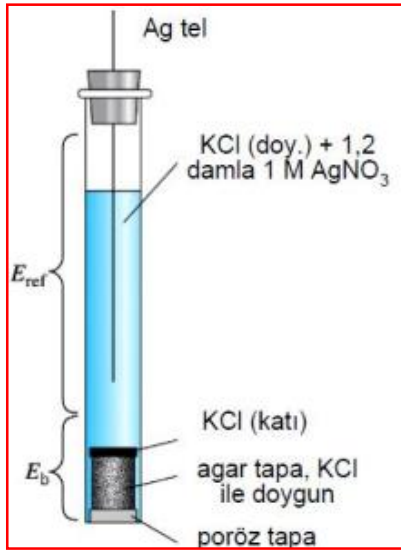


Şekil 17: EIS ölçümü için 14 haneli oosit mikroçipi

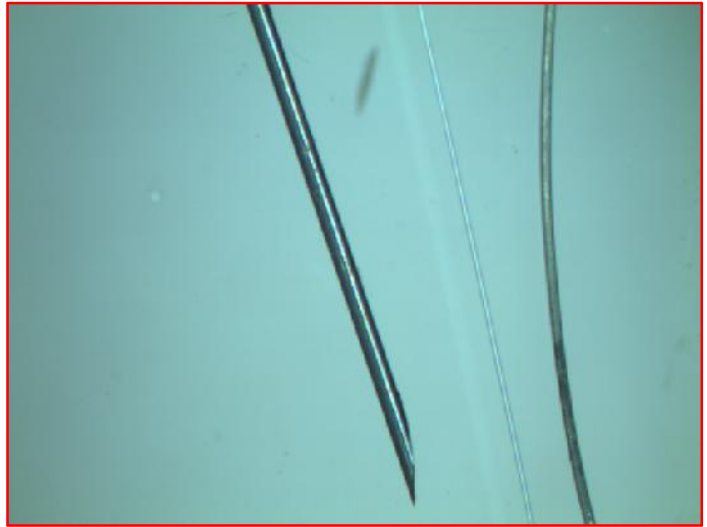
3.5.1.2. Oosit ölçümü için hazırlanan Gümüş Klorür elektrotu

Oosit EIS ölçümü için, Ag/AgCl referans elektrot ve direkt ölçümü için Ag elektrotu hazırlandı. Gümüş klorür elektrot, gümüş klorür ile doymuş potasyum klorür çözeltisine daldırılmış bir gümüş elektrottur. Pek çok elektro analitik uygulamalarda elektrotlardan birinin yarı-hücre potansiyelinin bilinmesi, sabit olması ve ortamdaki çözeltinin bileşiminden etkilenmemesi arzu edilir. Buna uygun bir elektrotta " Referans elektrot" denir (77).

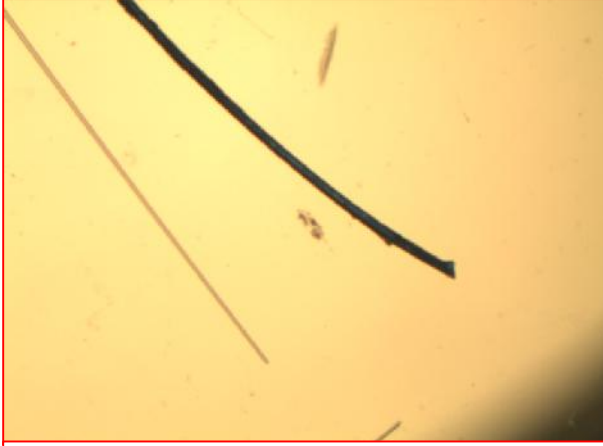
Gümüş klorür elektrotlar ticari olarak bulunabildiği gibi laboratuvar koşullarında da yapılabilir. Gümüş- doymuş gümüş klorür elektrotun potansiyeli 25°C'de standart hidrojen elektrotuna göre 0,199 voltur. Normal bir elektrotun yapısı basittir (Şekil 18) ve kolaylıkla hazırlanabilir. Biz oosit ile çalıştığımız için bir mikro elektrottan yararlandık (Şekil 19-21). Referans mikro elektrotları gümüş/ gümüş klorür solüsyonunda tutuk ve deneyden önce ortamla iyice temizledik ve set-up yaptık (52, 53).



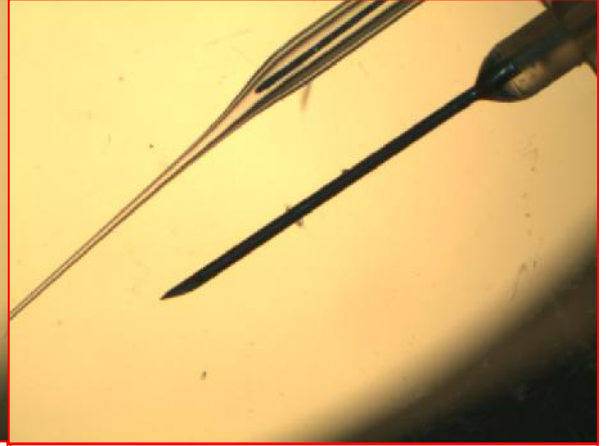
Şekil 18: Referans elektrotun şeması



Şekil 19: Mikroelektrot. Solda 30G iğne başı. Ortada alev üzerinde çapını düşürdüğümüz mikropipet, Sağda 230µm çapında gümüş tel.



Şekil 20: Mikroelektrot. Solda referans mikro elektrotu, Sağda 230µm çapında gümüş tel ile kıyaslaması



Şekil 21: Mikroelektrot. Solda referans mikro elektrot ve içindeki AgCl ile kaplanmış gümüş telin sağda insülin iğnesi ile kıyaslaması

3.5.1.3. Elektriksel yöntemle gümüş telin ince bir AgCl tabakasıyla kaplanması

- 1) Parlak gümüş bir elektrot 0.1M hidroklorik asit içine yerleştirildi.
- 2) Bu 230µm tel DC güç kaynağının pozitif kutbuna bağlandı.
- 3) Bir adet pilin kömür elektrotu katot yerine kullanıldı.
- 4) Solüsyondan 30 sn boyunca 2.5mA/cm akış sağlandı. Elektroliz sırasında akımın

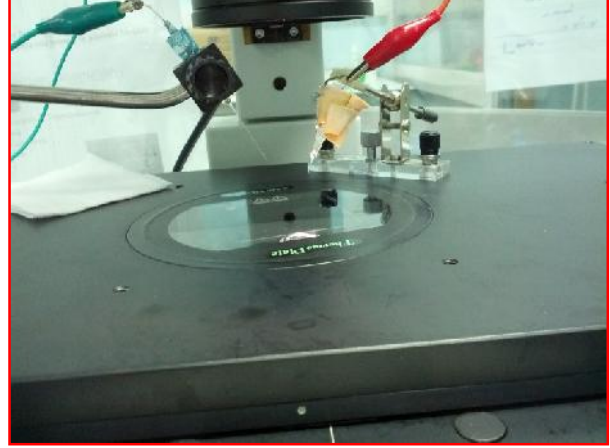
yoğunluğunun 0,6 mA/cm daha az olmaması sağlandı. Çünkü düşük akım yoğunluğu, elektrot yüzeyinde ışığa duyarlı gri bir tabaka oluşturur ve bu elektrot yanıtının hatalı olmasına sebep olur.

Bizim hazırladığımız referans gümüş klorür elektrotu, standart gümüş klorür elektrotları gibi gümüş bir telden oluşturuldu. 200 µm çapındaki gümüş telinin üzerini elektrik yöntemiyle ince bir gümüş klorid (AgCl) tabakasıyla kaplandı. Kaplanmış tel, doymuş potasyum klorür çözeltisine koyuldu. Alev üzerinde çekerek mikro pipetin ucu 50 µm çapına düşürüldü ve agarla kapatıldı. Aslında ortam veya oosite yaklaşan ucu ince olduğu için poröz cam diske ihtiyaç duyulmadı ve bir agar jeli tıpa konularak yarı-hücreden çözelti sızması önlendi. Küçük, steril cam kavanozda 1gr saf agar, 100 ml suda çözülüp, berrak bir çözelti elde edilinceye kadar ısıtıldı. Sonra 35 gr potasyum klorür ilave edildi. 1 cc çözelti sıcakken, tüpün ucu buna hızla daldırıldı. Soğuduğu zaman, elektrik direnci düşük bir jel halinde katılaştı. Jelin üstüne bir tabaka katı potasyum klorür konuldu ve tüp doymuş potasyum klorür çözeltisi ile dolduruldu. Sonra en fazla 50µL, 1M gümüş nitrat çözeltisi ilave edildi ve bu çözeltiye 200µm kalınlığında gümüş bir tel daldırıldı. Yapıştırıcıyla diğer ucu kapatıldı ve telin serbest kısmı altın ayakla

ölçüm için hazırlandı. Mikro elektrot korunması için eppendorf ucuna yerleştirildi. Hazırladığımız referans mikroeletrotlar Ag/AgCl solüsyonunda tutuldu (Şekil 22-25)(53).



Şekil 22: Hazırlanmış referans mikroeletrotlar



Şekil 23: 'Microdrive' üstüne monte edilmiş referans mikro elektrot.



Şekil 24: EIS cihazı ile Ag telin ince bir gümüş klorür (AgCl) tabakasıyla kaplanması



Şekil 25: Ag/AgCl solüsyonu

3.5.2. Vasektomi işlemi

Erkek grubu (A) olarak 15 adet 8-16 haftalık Wistar Albino suşu rat, 3 alt gruba ayrıldı. A₃ (5 adet) grubundaki tüm ratlara vasektomi yapıldı. Aynı sperm aspirasyonu gibi, skrotumdan 0,5 cm yukarı (Penis hizasında) cilt kesildi ve hemen testisten çıkan vas deferens kanalı bulundu. 4-5 mm katgütle vas deferens bağlanıp küçük makasla vas deferens kesildi (Şekil 26). Testis skrotumdaki yerine alınıp cilt dikildi ve 37°C rat 30 dk bekletildi (Şekil 27) ve 10 gün sonra kısır erkek rat kullanıma alındı (Şekil 28) (62, 63, 72). Bu grubun kısırlığından emin olmak için vasektomi olan rat, poösterus evresinde olan dişi ile aynı kafese koyuldu. Ertesi

gün vaginadan smear alındı ve sperm olup olmadığı kontrol edildi. Tüm cerrahi işlemler başarılıydı.



Şekil 26: E₁₁ Rat'ın sağ duktus deferens vasktomisi



Şekil 27: E₁₁ Rat'ın dikiş sonrası



Şekil 28: E₁₁ Rat'ın vasktomisi sonrası

3.5.3. Süperovulasyon işlemi

Yetişkin, 8-16 haftalık dişi Wistar Albino suşu ratlarda intraperitoneal (ip) süperovulasyon yapıldı (58-61, 69-72, 75, 78-84, 91, 93). Ratlar 65 nem, 20 – 25°C (ortalama 21±0.5°C) sıcaklık ve 12/12 saat karanlık/aydınlık dönemine 2 hafta boyunca uyum sağladılar. Süperovulasyon için aday rat smear yaymasıyla cinsel döngüsünün pro-östrus, östrus, di-östrus veya met-östrus evrelerinden hangisinde olduğu belirlendi. Östrus evresinde olan rat süperovulasyona alındı. Bu grubun ovulasyonunu indüklemek için saat 19:50 ve 20:00 arasında 25 - 30 IU eCG ve 48 saat sonra 25 - 30 IU hCG ip olarak verildi. Hormon enjekte edilenler ayrı kafeste, 15-16 saat bekletildikten sonra oosit toplama işlemine alındı (72, 94).

3.5.4. Mikroskopik Epididimal Sperm Aspirasyon

Bu metotta optik büyütme kullanılarak epididimden sperm elde edildi. Bu grubun erkeklerinden mikro enjeksiyon işleminden önce MESA ile sperm elde edildi. Erkek rat ketasol ile anestezi edildi (Ketamine 80-100 mg/kg ve Xylazine 5-10 mg/kg) (Şekil 29). MESA işleminde skrotumdan yukarı (penis hizasında) 0,5 cm, cilt kesildi ve hemen testisin apikalinde epididim bulundu. Bir pensetle epididimin kaudali bulundu (Şekil 30). Tespit edildikten sonra, 30G başlıklı insülin iğnesi ile epididimin içine az miktar ortam enjekte edildi ve hemen aspire edildi (Şekil 31). Rat oosit ve sperm manipülasyonu için kullanılan temel ortam Hepes içeren Krebs-Ringer bikarbonat çözeltisi ile modifiye edilmiş (mKRB-Hepes) ortamdır. Elde edilen spermeler falkon tüpüne koyuldu. Testis skrotumdaki yerine alınıp, cilt dikildi. Sperm hazırlanma aşamasına geçildi (Şekil 32, 33). Sperm sayım işlemi neubauer lamında (Hemasitometre) yapıldı (Şekil 34) (6, 23, 27, 35- 36, 44, 70-76, 88, 92- 102).



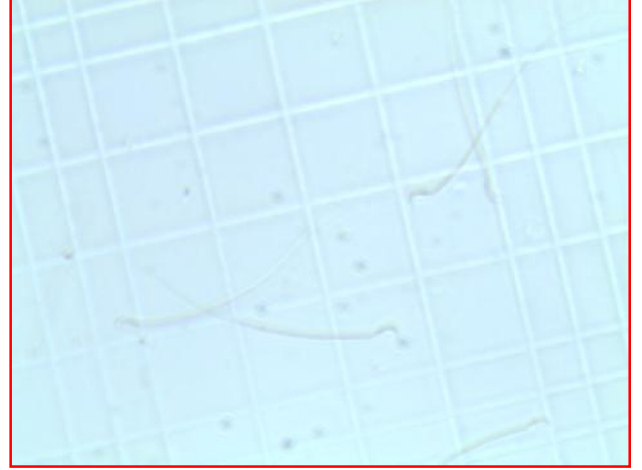
Şekil 29: MESA uyguladığımız erkek rat



Şekil 30: MESA yöntemini uygularken epididimin kaudası görülmekte



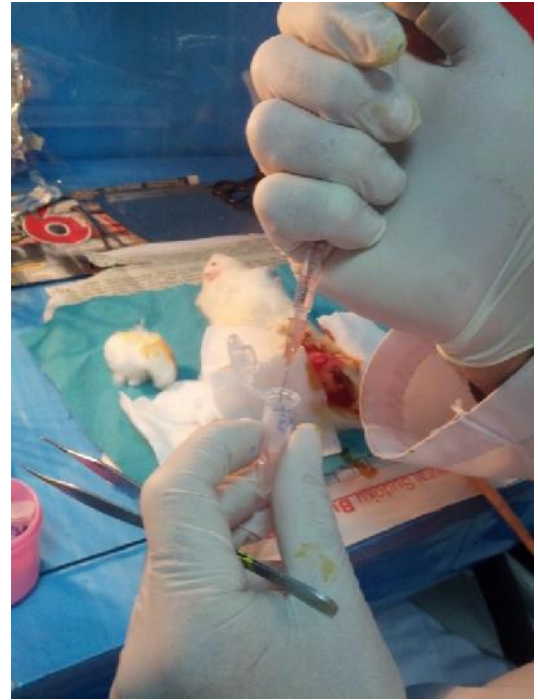
Şekil 31: MESA aspirasyonu: insülin iğnesi ile epididimin içine az miktar ortam enjekte edildi. Hemen sonrasında ortam, spermle birlikte aspire edildi.



Şekil 34: Rat sperm sayımı (Neubauer lam)



Şekil 32: Sperm aspirasyonu



Şekil 33: Spermilerin falkona aktarılması

3.5.5. ICSI yöntemine göre oosit toplama işlemi

Oosit ve sperm manipülasyonu için kullanılan temel ortam hepes içeren bikarbonat çözeltisi ile modifiye edilmiş Krebs-Ringer (mKRB-Hepes) ortamıdır (58, 61, 72, 74, 75, 83, 84, 91, 93).

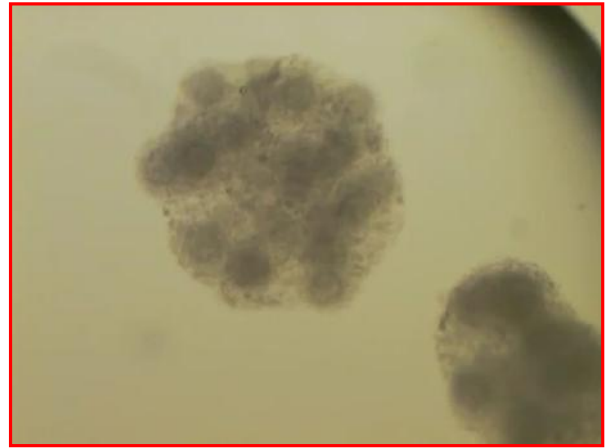
Tablo 8'e (58, 60, 69, 70, 72, 75) göre bu ortam, aslında NaHCO₃ konsantrasyonunun 25.07mM'den 5,0 mM 'e indirilmesinin ve 20 mM Hepes ilave edilmesinin haricinde rat oositlerin IVF için Toyoda ve Chang tarafından kullanılanın aynısıdır (69).

Embriyo kültürü için kullanılan ortam mR1ECM ve DMEM-F12 ortamıdır (58, 60, 69, 70, 72, 75,).

Dişiler hCG enjeksiyondan 15-16 saat sonra oosit toplama işlemine alındı. Oosit toplamak amacıyla dişi rat %10 Ketazol ile anestezi edildi ve dekapite edilerek öldürüldü. Steril durumda cilt ve karın kasları ayrıldı ve hemen bağırsakların kenarında uterus görüldü. Bir ince makasla ovaryum ve fallop tüpleri uterusdan ayrıldı. Eksize edilen tuba uterina bir polistiren kültür kabındaki (35 mm ×10 mm) % 0,1 (w / v) sığır testislerinden alınmış hiyaluronidaz ile takviye edilmiş 37°C 'deki mKRB-Hepes küçük bir damlasına (100-200 µl) yerleştirildi.(Şekil 35). Kümülüs hücreleri ile oositler tuba uterinanın ampuller kısmından serbest bırakıldı ve yaklaşık 5.dk ortam içinde tutuldu. Bu işlemler invert mikroskop ile gerçekleştirildi. Kümülüs hücrelerini oositten uzaklaştırmak için farklı pipetlerle (200. 150 ve 120 µm) pipetlendiler ve Sürekli yıkandılar. Pipetler laboratuvarımızda alev üstünde steril pastor pipetini çekerek hazırlandı. Kümülüstan ayrılan serbest oositler üç kez NaHCO₃ (konsantrasyon 25.07 mM) içeren Hepes'siz mKRB ortamla yıkandı ve 100µl aynı ortam içine yerleştirildi. Bir CO₂ inkübatör (%5CO₂ 37oC atmosfer) içinde sperm mikro enjeksiyonuna kadar, 1 saat inkübe edildi (Şekil 36).(72, 86- 102).



Şekil 35: Rat tuba uterina ve ovaryumu

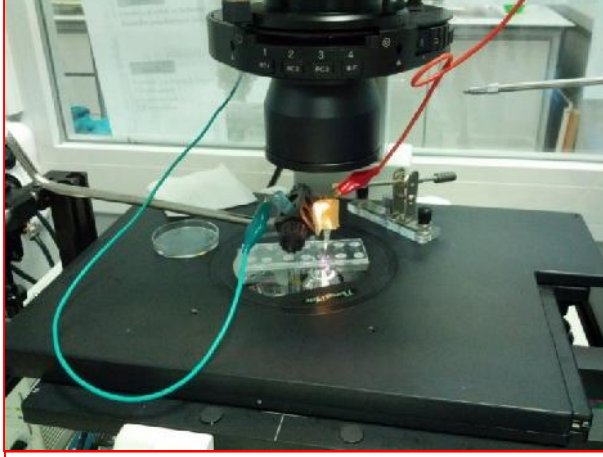


Şekil 36: Bir damla ortam içinde yeni toplanmış oositler(×100)

3.5.6. Toplanan oositlere uygulanan işlemler

Oositleri toplamadan önce hangi gruba ait olduğu belli olsun diye isimlendirildi ve guruba göre ön hazırlıklar yapıldı. Toplanan oositler EIS (+) olanlar ICSI işleminden önce EIS

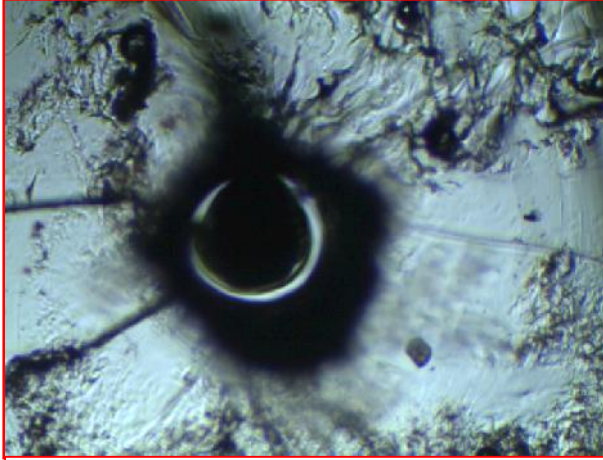
yöntemiyle değerlendirildiler. EIS(-) olanlar EIS yöntemiyle değerlendirilmeden, ICSI işlemine alındılar. Oluşan embriyolar 3.gün bir yalancı gebe dişiye transfer edildiler (Şekil 37-40) (92-107).



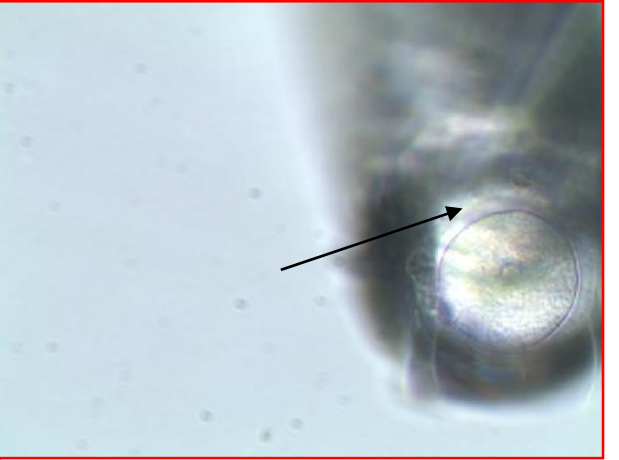
Şekil 37: Oositin EIS yöntemi ile değerlendirilmesi



Şekil 38: Hazırladığımız mikroçip içinde referans elektrotun yerleşimi



Şekil 39: Hazırladığımız mikroçip içinde referans elektrotun yakından görünümü.



Şekil 40: Hazırladığımız mikroçip oosite çok yakın ölçüm halinde. Ok; ZP(×400).

3.5.7. Toplanan oositlerin ICSI işlemi için yapılan hazırlıklar

Bu aşamadaki işlem ve kullanan malzemeler aynı tüp bebek merkezlerindeki gibiydi. Fakat embriyo kültürü için kullanılan ek ortam mR1ECM idi ve mikro enjeksiyon bu ortamda gerçekleşti. Spermiler az hareketli olduğu için PVP az kullanıldı (8, 54, 55, 58, 60, 61, 69, 72). ICSI amaçlı toplanan oositler döllenme sonrası B_{2.2.1} (ICSI+/EIS+) ve B_{2.2.2} (ICSI+/EIS-) gruplarına transfer edildi. Kumulustan serbestleşen oositler üç kez 25.07 mM NaHCO₃ içeren Hepes'siz mKRB ortamı ile yıkandı ve 100µl aynı ortam içine yerleştirildi.

B_{2.2.2} (ICSI+/EIS-) grubundaki EIS olmayan aday oositler CO₂ inkübatör (%5 CO₂ ve 37°C atmosfer) içinde sperm mikro enjeksiyonuna kadar, 1 saat inkübe edildi.

B_{2.2.1} (ICSI+/EIS+) grubundaki aday oositler aynı diğer gruplar gibi günümüzdeki YÜT'lerin kriterlerine göre seçildi (23-28). Fakat mikro enjeksiyondan önce oositlerin EIS değerleri ölçüldükten sonra ICSI işlemi tamamlandı (Şekil 46-51). 3. gün embriyolar, hazırlanan yalancı gebe dişiye transfer edildi (Şekil 41-46) (23, 25, 26, 72, 103-115, 117, 118).



Şekil 41: ICSI 1.aşaması



Şekil 42: ICSI 2. aşaması



Şekil 43: ICSI 3. aşama



Şekil 44: ICSI 4.aşaması



Şekil 45: ICSI 5.aşaması



Şekil 46: ICSI 6.aşaması

3.5.8. Yalancı gebelik grubu (B₂) hazırlanması

Bu gruptaki dişiler iki büyük alt gruba ayrılıp, sırasıyla B_{2,1} (IVF) ve B_{2,2} (ICSI) olarak tanımlandılar. Daha önce de belirttiğimiz gibi bu tezde B_{2,2} (ICSI) grubunun verilerini değerlendirildi. Yalancı gebe dişileri hazırlamak için EIS yöntemine göre numaralandırıldı. Standart olarak bir yetişkin alıcı dişiye sabah smear testi uygulanıp pro östrus evresi tespit edildi. Vasektomi olan erkekle 2 saat ışık periyodu bitmeden önce bir gece (karanlık dönem süresi) aynı kafeste bırakıldı. Çiftleşen dişiler, yalancı gebelik grubu olarak isimlendirildi. Hazırlanan dişilere 4 – 14 adet arasında embriyo transfer edildi (8, 54, 55, 58, 60, 61, 69, 72). Ortalama 17 ve 18. günden sonra doğum yapan bu gruplar, yavruları sayıldıktan sonra normal ve sağlam rat olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Havanları AD'na teslim edildi.

3.5.9. Embriyo transferi

Oositler YÜT kriterlerine göre seçildi (Şekil 47- 50). Fertilizasyon sonrası aşamalar (12, 24, 48 ve 72 saat) kontrol edildi (Şekil 51-60). Bizim çalışmamızda 42 - 72 saatler arasında, morula evresindeki embriyolar transfer edildi.

Embriyo seçimi IVF/ICSI yönteminde aşağıdaki kriterlere göre yapıldı (26).

- a) Blastomer sayısı = $4 \geq$ Blastomer sayısı ≤ 8 b) Blastomer büyüklüğü = eşit
- c) Fragmantasyon $< \%20$ d) Blastomerin multinukleasyonu = 0

Pasteur pipeti alevde çekerek inceltildi. Transfer pastör pipetine önce biraz sıvı parafin, sonra sırasıyla hava, M12 ya da F-mR1ECM ortam, tekrar hava, normalde en az 2 ve en fazla 7 adet morula, hava ve sonunda tekrar ortam çekildi (Şekil 61-63). Her yalancı gebe için 2 tane pipet hazırlandı. Bu pipet stereo mikroskopunun kenarına koyuldu. Önceden hazırlanan yalancı gebelik dişi rat, anestezi edildi. Ratın karın kısmına antiseptik uygulandıktan sonra kılları traş edildi (şekil 64-65). Traş olduğu bölgeye en ve uzunluğu 1,5 cm² bir cilt kesisi yapıldı. (Şekil 66). Karın kasları kenara ayrılıp bir küçük pensetle bağırsakların alt kısmından uterus dışarı çıkarıldı (Şekil 67). Uterus kısmında iğne ile (26G başlıkla) bir delik açılıp, pipetle buradan transfer işlemi yapıldı (Şekil 68-69). Bu kısım, dikildikten sonra (Şekil 70) rat 30 dk 37°C bir yerde gözlem altına alındı (Şekil 71-72). Tek tek kafeslerde olmaları tercih edildi (Şekil 73). Ortalama 17-18. günden sonra doğumları beklendi (Şekil 74). Gebe kalan ve doğum yapanlar

işlemin başarılı olduğunu kanıtladı. Laktasyon sürecinden sora yavrular Deney Hayvanları AD' na teslim edildi (Şekil 75).



Şekil 47: Seçilen oosit. A; Pronükleus, ok: zona pellusida, B; kumulus hücreleri(×200).



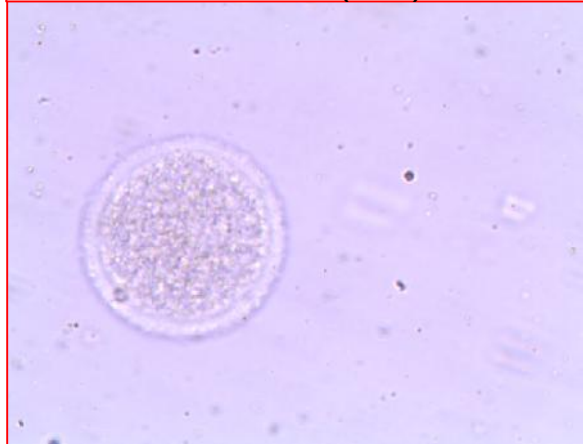
Şekil 48: Seçilen oosit pipetleme aşamasında. A; Pronükleus, ok: zona pellusida, B: kumulus hücreleri(×400)



Şekil 49: ICSI işlemine hazırlanan oosit; Ok; birinci cisim (×200).



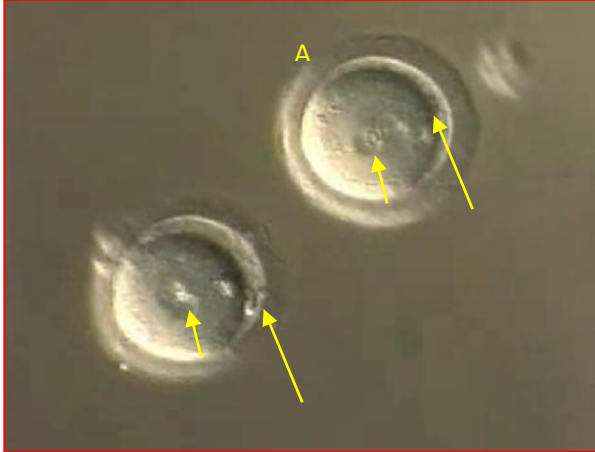
Şekil 50: ICSI işlemine hazırlanan oosit; Ok; birinci cisim, A: ZP(×200).



Şekil 51: ICSI işleminden yaklaşık 14 saat sonra (×200)



Şekil 52: ICSI işleminden yaklaşık 16 saat sonra (×400)



Şekil 53: Fertilizasyon sonrası 16.-18. saat. Kısa Ok; 2 Pronükleus. Uzun oklar: Birinci cisim. A; ZP (×200).



Şekil 54: Fertilizasyon sonrası 16.-18. saat. Ok; 2 Pronükleus, A; ZP (×400)



Şekil 55: Fertilizasyon 1. günü; Normal bölünme (×400).



Şekil 56: Fertilizasyonun 2. günü; Normal bölünme ve 4 simetrik blastomer (×400).



Şekil 57: Fertilizasyonun 2. günü sonu; Normal bölünme ve 6 simetrik blastomer (×400).



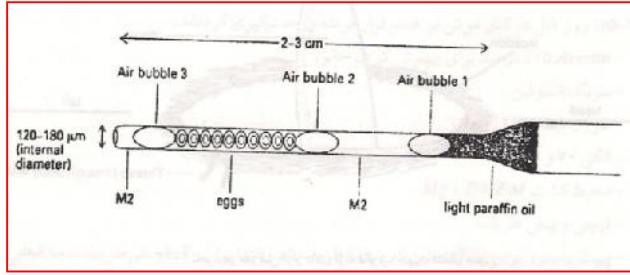
Şekil 58: Fertilizasyonun 3. günü; Normal bölünme 8-16 simetrik blastomer. (Transfere aday morula)(×200)



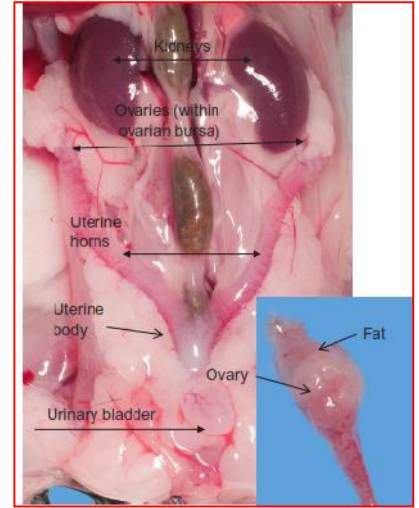
Şekil 59: Fertilizasyonun 5. Günü. Ok: Dış hücre kütlesi(×400).



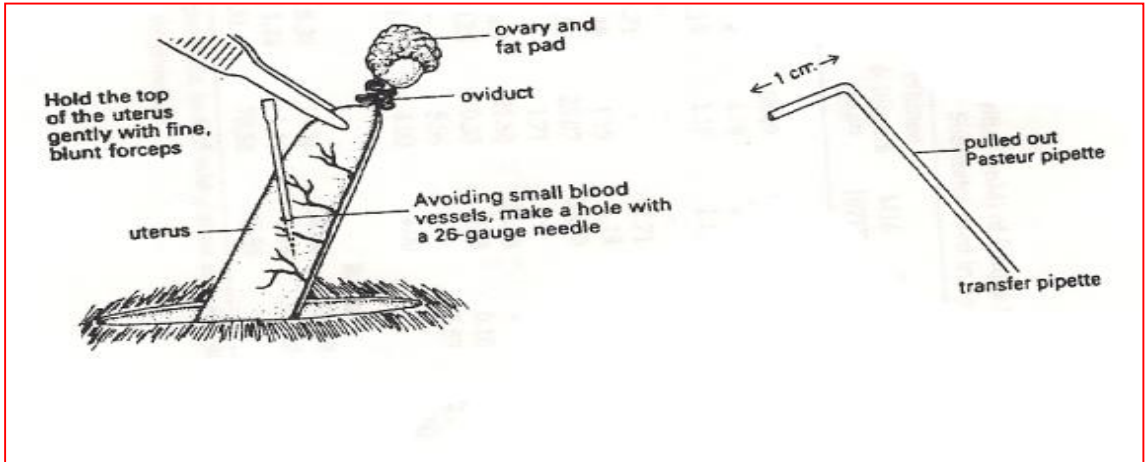
Şekil 60: Fertilizasyonun 5. günü; Ok: İç hücre kütlesi(×400).



Şekil 61: Şematik olarak transfer pipetinin hazırlanması



Şekil 62: Rat uterusun anatomisi ve ayrıntıları



Şekil 63: Şematik olarak transfer işlemi



Şekil 64: Anestezi edilip, traşlanmış yalancı gebelik grubuna ait rat



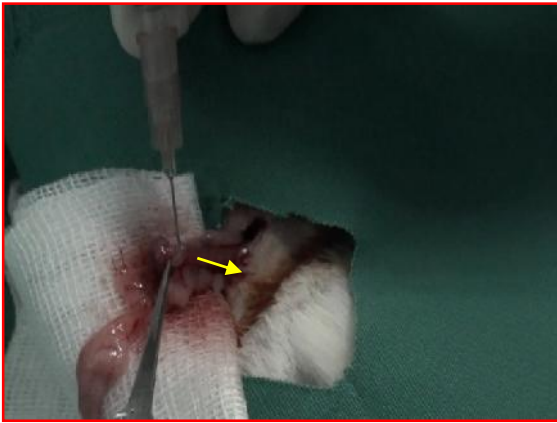
Şekil 65: Operasyon bölgesi batikonla dezenfekte edildi



Şekil 66: Operasyon bölgesinde 0,5 -1 cm bir kesi (Ok)



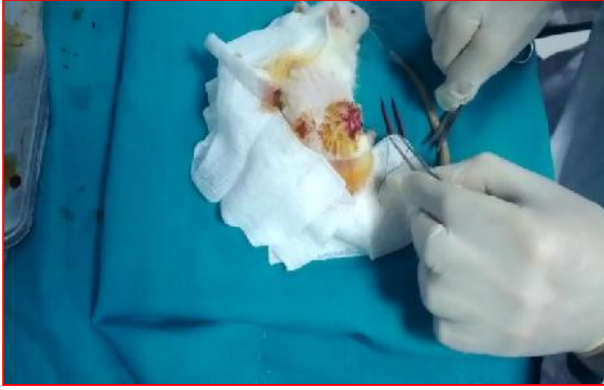
Şekil 67: küçük kesiden uterus bulunup dışarı çıkarıldı (Ok)



Şekil 68: Uterus steril gazlı bez ile sabitlendi



Şekil 69: Uterus pensetle sabitlendi ve pipetle embriyolar transfer edildi



Şekil 70: Transfer sonrası dikiş atıldı



Şekil 71: Diğer boynuza da aynı transfer işlemi uygulandı



Şekil 72: Transfer sonrası kafeste tek olarak tutuldu



Şekil 73: Transferden 2 gün sonra



Şekil 74: Transferden 18 gün sonra doğum yapan anne (8 transferden 6 doğum)



Şekil 75: Yavrular 3 hafta laktasyon sonrası Deney Hayvanları AD' na teslim edildi

3.6. Araştırmanın Değişkenleri:

Erkek grubuna (A₁, A₂, A₃) herhangi bir ilaç verilmedi. A₂ grubuna vasktomı yapıldı.

A₁ ve A₃ gruplarından MESA ile elde edilen spermlere swim- up ve santrifüj işleminde kullanılan ortam dışında herhangi bir ilaç verilmedi.

Çalışmada dişi kontrol grubu olarak kullanılan ratların oositleri, tüp bebek merkezlerinde olduğu gibi, sadece YÜT kriterlerinden yararlanılarak seçildi (EIS –)(26).

B₁ ve B₃ gruplarından toplanan oositlerin yarısında sadece YÜT kriterlerinden yararlanırken (ICSI+/ EIS –) diğer yarısında YÜT kriterlerine ek olarak EIS yönteminden yararlanıldı (ICSI+/ EIS +).

B₁ ve B₃ grubunda 20 adet dişinin önce smear yaymasıyla östrus döngüsünde olduğu tespit edildi. 25-30 IU eCG ve 48 saat sonra 25-30 IU hCG ip enjekte edilerek süper ovulasyon gerçekleştirildi. Bu iki gruba hCG enjeksiyonundan 15-16 saat sonra %10'luk ketasol ile anestezi yapıldı. Toplanan oositlere kullanılan medium dışında herhangi bir ilaç verilmedi.

B₂ alt gruplarındaki ratların smear yaymasıyla pro-östrus döneminde olup olmadığı tespit edildi. Ancak tespit yapılırken herhangi bir özel ilaç verilmedi.

Embriyo transferi için B₂ alt gruplarına 10-15dk %10'luk ketasol ile anestezi yapıldı.

Bu embriyo transferini uyguladığımız yalancı gebelik dişiler, doğum sonrası sağlıklı yavruları ile birlikte, pilot hayvan olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'na teslim edildi.

3.7. Veri toplama araçları:

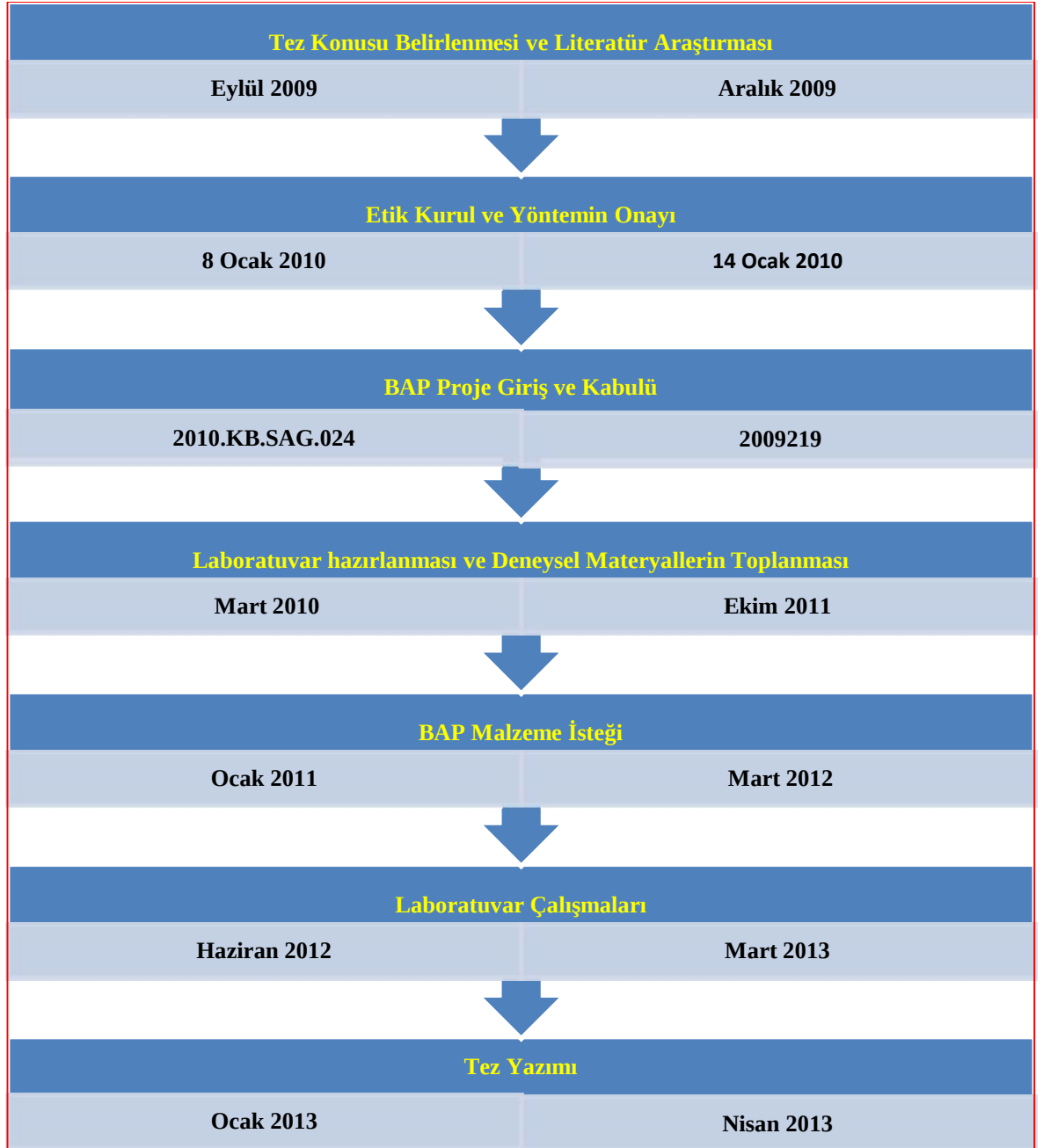
3.7.1. Araştırmada kullanılan demirbaş malzemeler:

Tablo 6: Araştırmada kullanılan demirbaş malzemeler			
Sıra	Demirbaş adı	Modeli	Açıklama
1	Stereo Zoom Mikroskop	CARL ZEISS 2000-C model Stereo Zoom Mikroskop; • 10X Oküler Çifti, Model Stand N ile birlikte komple	
2	Inverted Mikroskop, ICSI Sistem Uyumlu:	CARL ZEISS Marka AXİO OBSERVER A1 Model Hoffman Modülasyonlu.	Hücre, doku kültürü ve YÜT çalışmalarına uygun
3	CO ₂ /O ₂ İnkübatör	: RS-BIOTECH/ İngiltere Marka CO170R-230-1000 GALAXY 170R Model.	Hücre ve embriyo uygulamaları.
4	EIS 300 ve Series G750 Potansiyostat sistem	Frekans Aralığı: 10 µHz – 300 kHz AC Amplitude: 27.6 µV – 1.81 V rms	Potentiostatic EIS Multiplexed Potentiostatic EIS Galvanostatic EIS Hybrid EIS Single Frequency EIS
5	Mikromaniplatör Sistemi.	• OLYMPUS MN-151 • OLYMPUS ON-IX99 • OLYMPUS IM-9B • OLYMPUS ON-IXS-2 • OLYMPUS NR	ICSI için
6	Santrifüj	Sigma 1-14	Sperm hazırlaması

3.7.2. Araştırmanın yöntemleri

Çalışmada kullanılan tüm yöntemler deney aşamaları kısmında açıklanmıştır.

3.8. Araştırmanın Planı ve Takvimi:



3.9. Verilerin değerlendirilmesi:

EIS verileri EIS 300'e ait özel Gamry Analiz programında değerlendirildi. Veri analizleri Windows 8'e uygun SPSS 'in 15.0 versiyonu ile yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada T-student testi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Varyasyon 0,5'den az olan ölçümlerde doğruluk $>95\%$ kabul edildi.

3.10. Araştırmanın sınırlılıkları:

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır.

3.11. Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 08.01.2010 toplantı No, 14.01.2010 toplantı tarihinde 03/2010 protokol No. ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Etik kurul onayı Ek-1 ve Ek- 2 olarak teze eklenmiştir (Ek 1 - 2).

4. BULGULAR

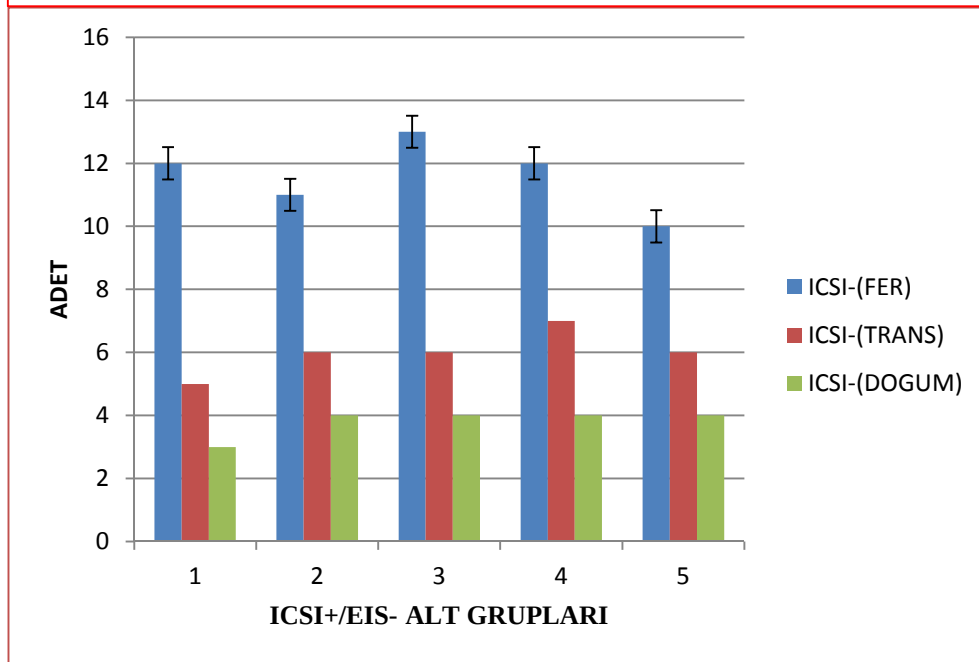
4.1. B_{2.2.2} Grubu (ICSI+/ EIS -): EIS yönteminden yararlanmadan ICSI uygulanması

B_{2.2.2} (EIS -) gruptaki 5 ratın her biri için ayrı ayrı oosit sayısı, fertilizasyon, embriyo transferi ve doğum sayısı değerlendirildi (Tablo 7, Çizelge 1):

Tablo 7: EIS(-) grubuna ait veriler

B _{2.2.2}	EIS -	Toplanan oosit sayısı (Oocyte Pick Up)	Fertilizasyon sayısı	Transfer sayısı	Doğumda yavru sayısı
Grup 1	EIS -	17	12	5	3
Grup 2	EIS -	15	11	6	4
Grup 3	EIS -	16	13	6	4
Grup 4	EIS -	15	12	7	4
Grup 5	EIS -	14	10	6	4

Çizelge1: EIS(-) grubuna ait veriler

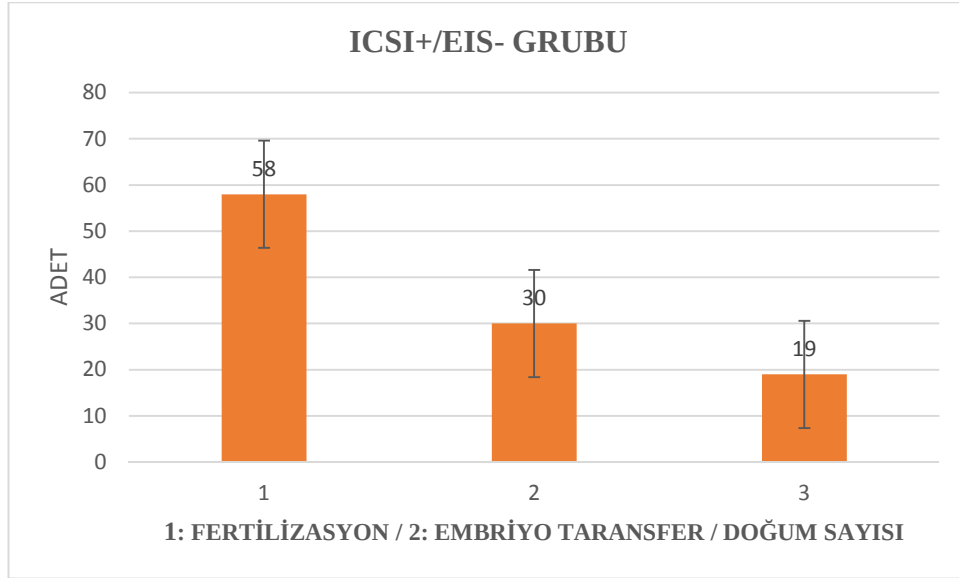


4.1.1. B_{2.2.2} (ICSI+/ EIS -) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi:

B_{2.2.2} grubundan elde edilen veriler: Grup içi ve gruplar arası ortalaması hesaplandı ve değerlendirildi (Tablo 8, Çizelge 2):

Tablo 8: (ICSI+/ EIS -) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi

EIS - (Oosit)	EIS - (FER)	EIS - (TRANS)	EIS - (DOĞUM)
77	58	30	19
-	% 75.32	% 51.72	% 63.33

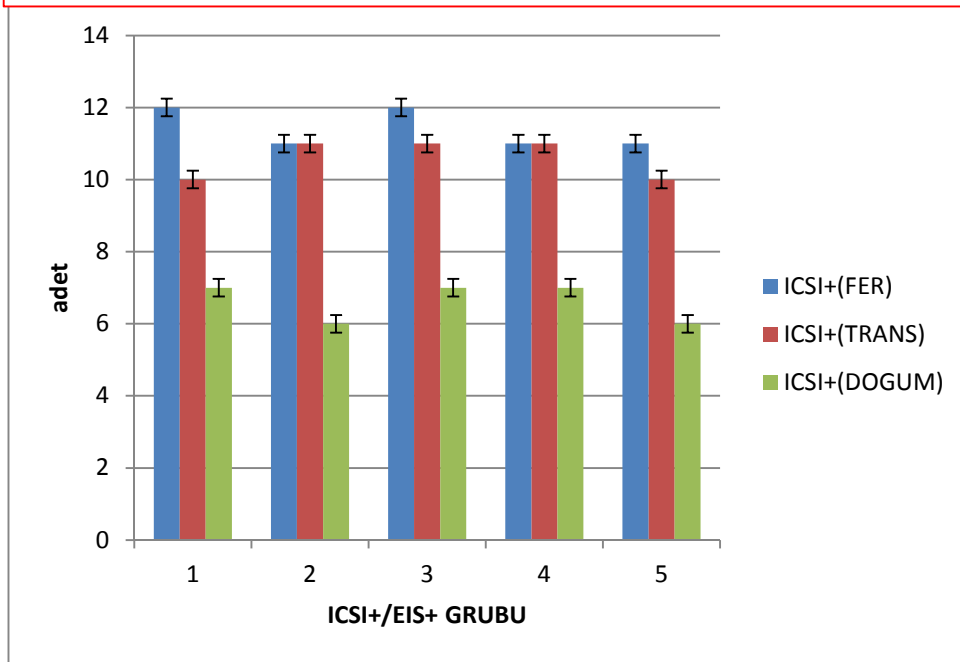
Çizelge 2: EIS(-) grubundaki fertilizasyon, transfer ve doğum sayıları

4.2. B 2.2.1 (ICSI+/EIS +):EIS yönteminden yararlanan oositler

B 2.2.1 (ICSI+/EIS +)gruptaki 5 ratın her biri için ayrı ayrı oosit sayısı, fertilizasyon, embriyo transferi ve doğum sayısı değerlendirildi (Tablo 9, Çizelge 3):

Tablo 9: EIS(+) grubuna ait veriler

B 2.2,1	EIS +	Toplanan oosit sayısı (oocyte pick up)	Fertilizasyon sayısı	Transfer sayısı	Doğumda yavru sayısı
Grup1	EIS+	15	12	10	7
Grup2	EIS+	14	11	11	6
Grup3	EIS+	13	12	11	7
Grup4	EIS+	12	11	11	7
Grup5	EIS+	14	11	10	6

Çizelge3: EIS(+) grubuna ait veriler

4.2.1. 2.2,1 (ICSI+/ EIS +) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi:

B 2.2.1 grubundan elde edilen veriler: grup içi ve gruplar arası ortalaması hesaplandı ve değerlendirildi (Tablo 10, Çizelge 4):

Tablo 10: (ICSI+/ EIS +) grubundaki verilerin sayısı ve başarı yüzdesi

ICSI+ (Oosit)	ICSI- (FER)	ICSI+ (TRANS)	ICSI+ (DOĞUM)
68	57	53	33
-	83.82	92.98	62.26

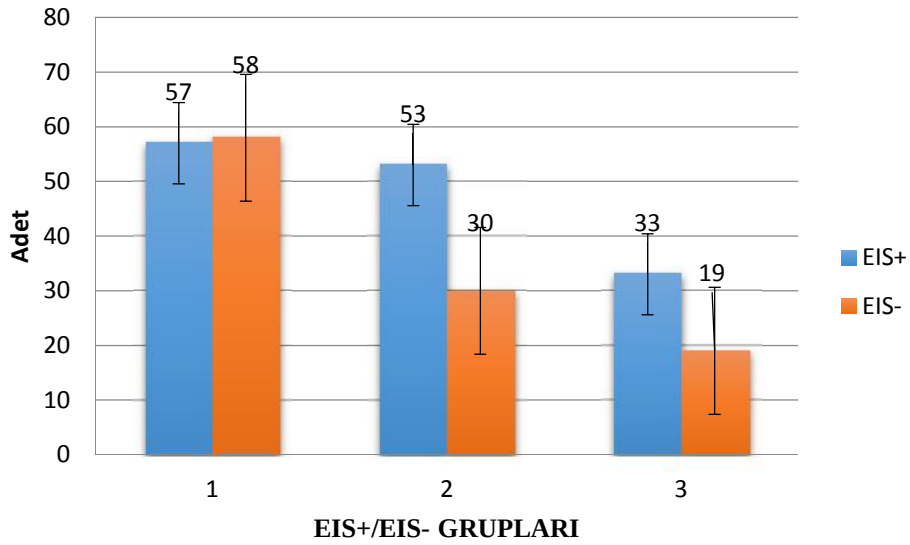
Çizelge 4: EIS(+) grubundaki fertilizasyon, transfer ve doğum sayıları



4.3. B_{2.2.1} (ICSI+/ EIS +) ve B_{2.2.2} (ICSI+/ EIS -) grupları arasında karşılaştırma:

Elde edilen verilerden EIS(+)/ EIS(-) arasında fertilizasyon, embriyo transferi ve doğum sayısı karşılaştırıldı (Çizelge 5):

Çizelge 5: EIS(+)/EIS(-) grubundaki fertilizasyon, transfer ve doğum sayıları



4.4. EIS ile elde edilen verilerin değerlendirmesi:

Süperovulasyon işleminden sonra 145 adet oosit toplandı. Toplanan oositlerden YÜT kriterlerine göre 115 tanesinin olgun oosit olduğunu tespit ettik.

Bunlardan 57 adet olgun oositi EIS yöntemiyle inceledik.

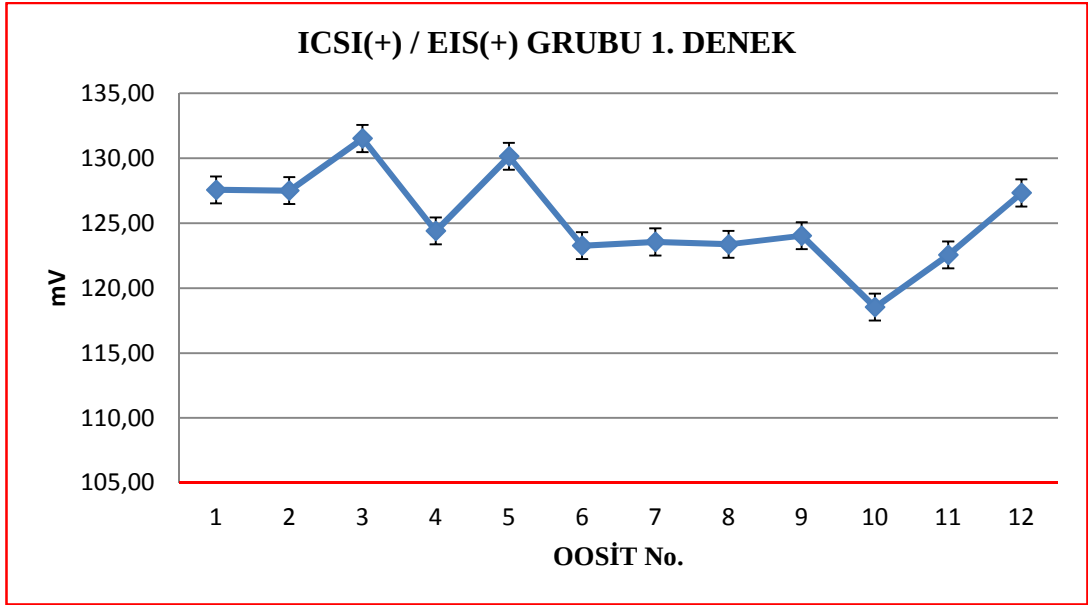
Aynı zamanda YÜT kriterlerine göre olgun olmayan oositleri EIS parametrelerine göre ölçtük. Fertilizasyon işlemi yapılmayan oositleri de apoptoz öncesi EIS yöntemiyle değerlendirdik.

B_{2,2,1} grubundaki oositleri, 300 sn boyunca 14 aşamada EIS potansiyelini Potansiyostat sistemi (EIS 300 ve Series G750,; Frekans Aralığı: 10 µHz – 300 kHz, AC Amplitude: 27,6 µV – 1.81 V rms) ile ölçtük. Her gruptaki oositleri ayrı tabloda not ettik.

4.4.1. B_{2,2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 1. deneğin EIS verilerinin aralığı:

Her oosit için tek başına ortalamasını hesapladık (Tablo 11) (Çizelge 6).

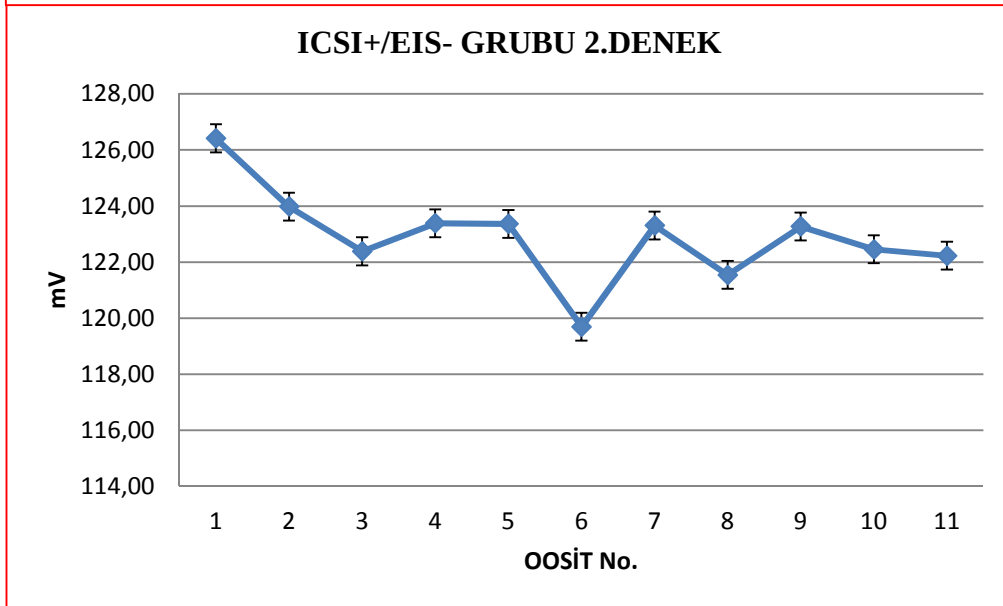
Çizelge 6: B_{2.2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 1. deneğe ait EIS ölçümü



4.4.2. B_{2.2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 2. deneğin EIS verilerinin aralığı:

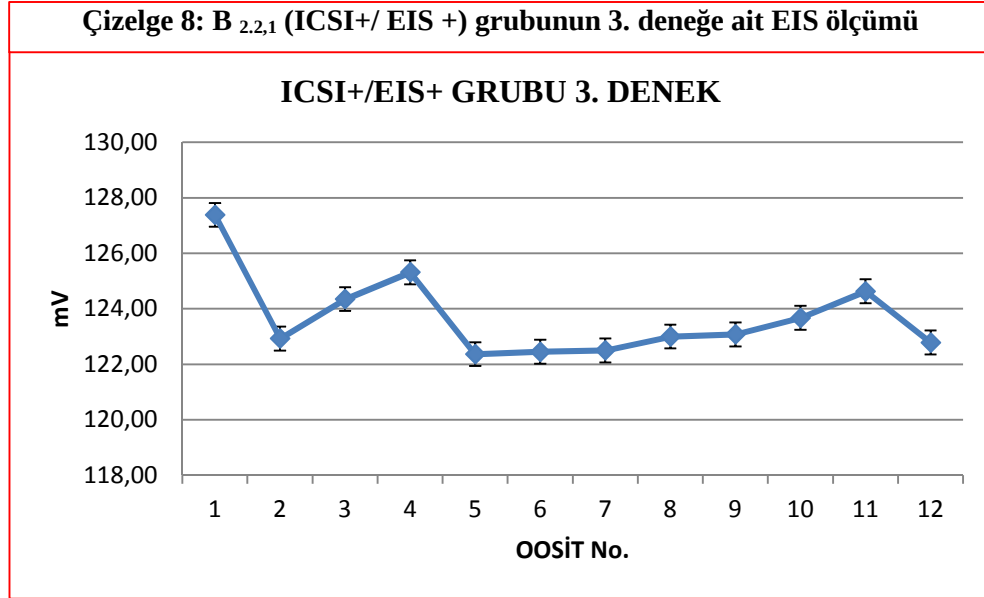
Her oositin ortalaması EIS'e göre hesaplandı (Tablo 11)(Çizelge 7).

Çizelge 7: B_{2.2,1} (ICSI+/ EIS +) grubunun 2. deneğe ait EIS ölçümü



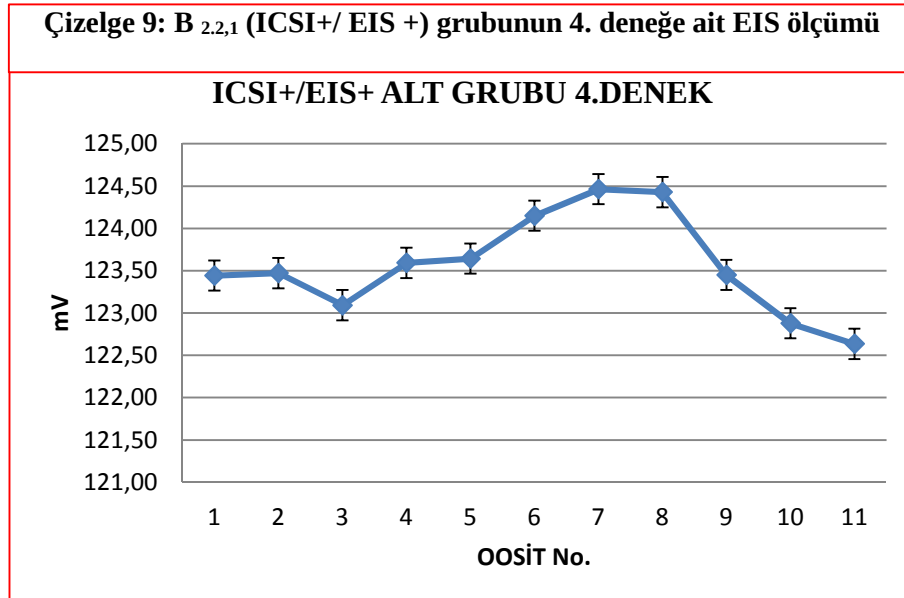
4.4.3. $B_{2,2,1}$ (ICSI+/ EIS +) grubunun 3. deneğin EIS verilerinin aralığı:

Her bir oositin ortalaması hesaplandı (Tablo 11) (Çizelge 8).



4.4.4. $B_{2,2,1}$ (ICSI+/ EIS +) grubunun 4. deneğin EIS verilerinin aralığı:

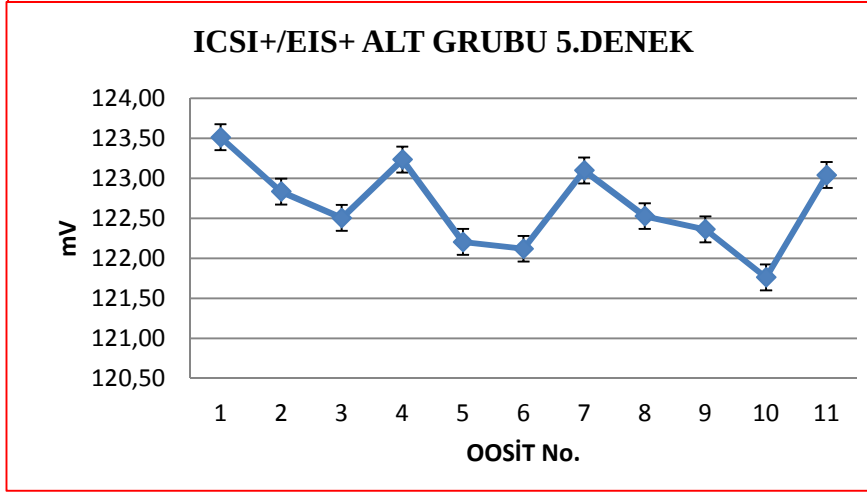
Her bir oosit ortalaması hesaplandı (Tablo 11) (Çizelge 9).



4.4.5. $B_{2,2,1}$ (ICSI+/EIS +) grubunun 5. deneğin EIS verilerinin aralığı:

Her oositin EIS'e göre ortalaması kullanarak hesaplandı (Tablo 11) (Çizelge 10).

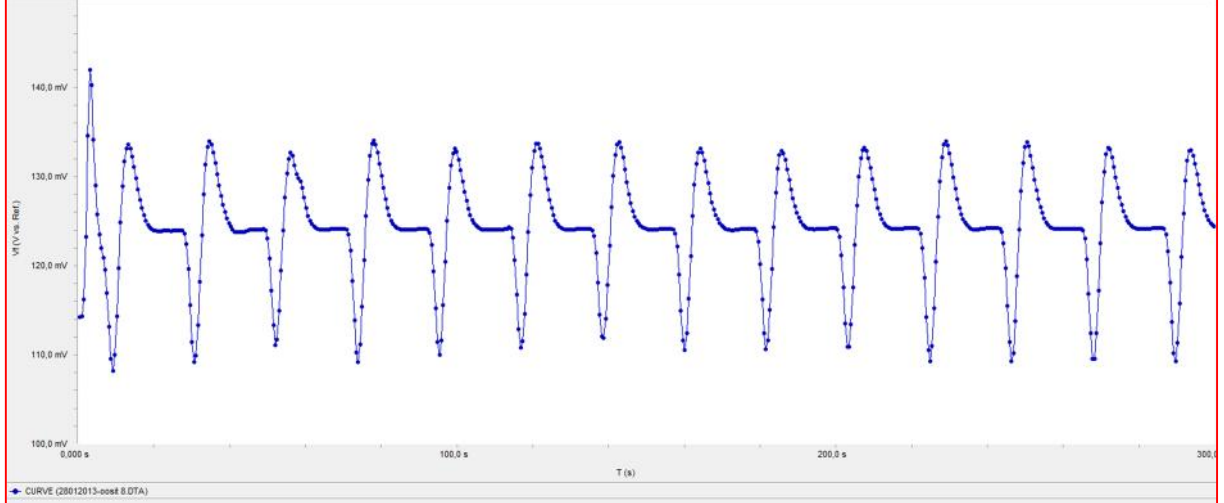
Çizelge 10: $B_{2,2,1}$ (ICSI+/EIS +) grubunun 5. deneğe ait EIS ölçümü



4.5. $B_{2,2,1}$ (ICSI+/EIS+) grubundaki oositlerin EIS ile elde edilen sonuçlarına ait çizelge:

Her olgun sayılan oosit için EIS potansiyel ölçümünü 300 sn boyunca 14 aşamada kaydettik. Her oositin kendi çizelgesinde EIS potansiyelinin ortalamasını hesapladık (Çizelge 11):

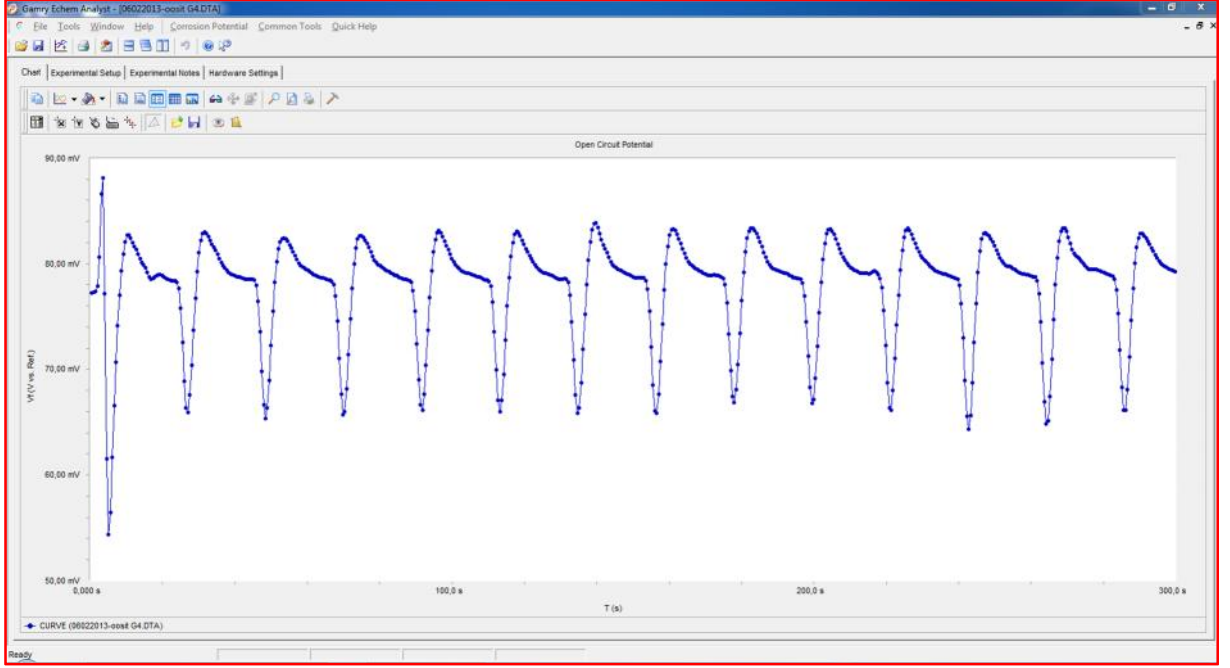
Çizelge 11: ICSI(+)/EIS(-) gruplarındaki olgun bir oositteki EIS ölçümünün çizelgesi



4.6. Karşılaştırma amaçlı olgun olmayan oosit için EIS çizelgesi:

Karşılaştırma amaçlı olgun sayılmayan oositler de EIS ile değerlendirildi (Çizelge 12):

Çizelge 12: ICSI +/EIS+ gruplarındaki olgun olmayan bir oositteki EIS ölçümünün çizelgesi



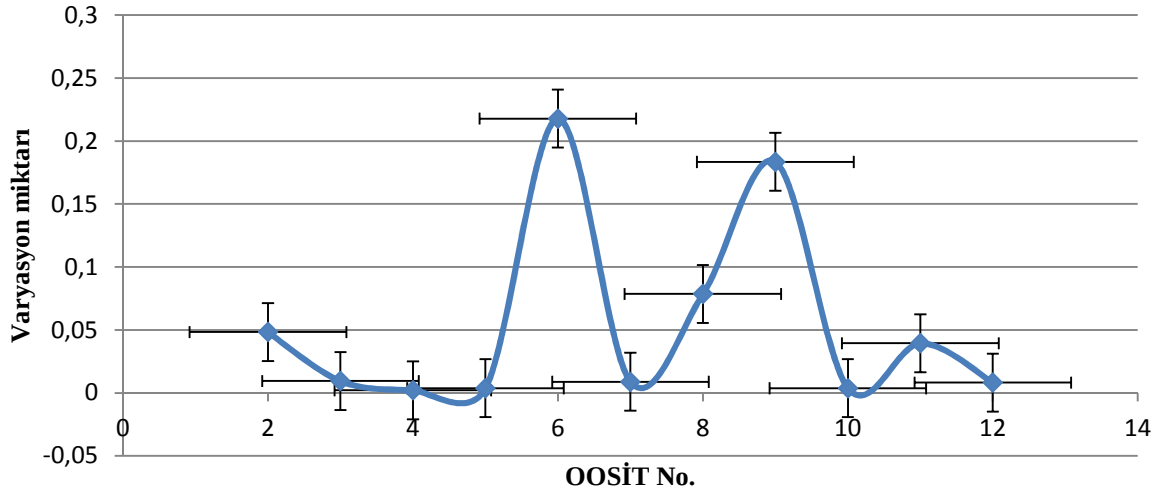
4.7. ICSI+/EIS+ verilerin varyasyon hesaplaması:

EIS potansiyel ölçümlerinin doğrulaması için ICSI+/EIS+ grubundaki tüm EIS değerlerinin varyasyonları hesaplandı (Tablo 11, Çizelge 13):

Tablo11: ICSI +/- EIS (+) arasında varyasyon miktarının değişimi

EIS+ Vf (Vvs.Ref)	1.denek	1.denek	2.denek	2.denek	3.denek	3.denek	4.denek	4.denek	5.denek	5.denek
.ICSI +	Orta. mV	Var.	Orta. mV	Var.	Orta. mV	Var.	Orta. mV	Var.	Orta. mV	Var.
1.Oosit	127.5643	0.070867	126.4143	0.061224	127.3857	0.092653	123.4429	0.129592	123.5143	0.048367
2.Oosit	127.5071	0.117806	123.9786	0.035969	122.9286	0.124898	123.4714	0.022041	122.8357	0.009439
3.Oosit	131.5214	0.107398	122.3857	0.098367	124.35	0.093929	123.0929	0.124949	122.5071	0.002092
4.Oosit	124.4	0.062857	123.3857	0.059796	125.3143	0.076939	123.5929	0.182092	123.2357	0.003724
5.Oosit	130.15	0.118214	123.3643	0.090867	122.3643	0.062296	123.6429	0.16102	122.2071	0.217806
6.Oosit	123.2714	0.079184	119.6929	0.109235	122.45	0.113929	124.15	0.028214	122.1214	0.008827
7.Oosit	123.5571	0.092449	123.3071	0.082092	122.5	0.111429	124.4643	0.063724	123.1	0.078571
8.Oosit	123.3786	0.523112	121.5429	0.069592	123	0.117143	124.4286	0.074898	122.5286	0.183469
9.Oosit	124.0429	0.049592	123.2714	0.422041	123.0786	0.151684	123.45	0.083929	122.3643	0.003724
10.Oosit	118.5357	0.090867	122.4571	0.14102	123.6714	0.069184	122.8786	0.440255	121.7643	0.039439
11.Oosit	122.5571	0.053878	122.2286	0.064898	124.6286	0.097755	122.6357	0.112296	123.0429	0.008163
12.Oosit	127.3286	0.046327	-	-	122.7857	0.174082	-	-	-	

Çizelge 13: ICSI +/- EIS (+) arasında varyasyon miktarının değişimi

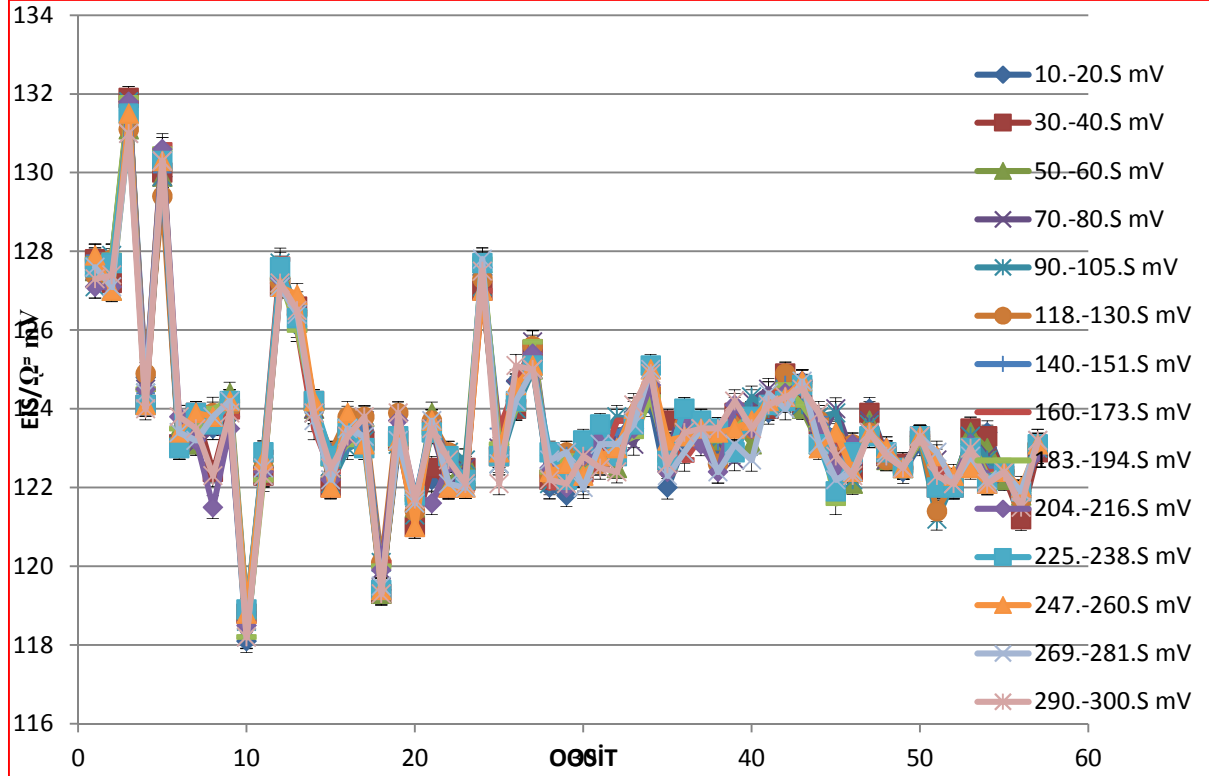


4.8. EIS ile Seçilen Oositlerin Fertilizasyon EIS Potansiyel Penceresinin Belirlenmesi:

Varyasyona dayanarak, EIS ile ölçülen elektriksel potansiyel tüm oositlerde değerlendirildi (Çizelge 11, 12). Elde edilen tüm verilerden olgun ve başarılı fertilizasyon için “ Fertilizasyon EIS Potansiyel Penceresi ” (Fertilization EIS Potential Window)’ (FEPW) adı altında gösterildi (Çizelge 15, 16).

Wistar suşu ratlarda, oosit için bulunan EIS Potansiyel Penceresi 118 ile 132 mV olarak kabul edildi. Fertilizasyon için uygun görülen oositler en az 118.5357mV, en fazla 131.5214 mV bulundu. Çoğunlukla 123.2714 mV gösterildi (Çizelge 14).

Çizelge 14: EIS ile Seçilen Oositlerin Fertilizasyon EIS Potansiyel Penceresinin Belirlenmesi



5. TARTIŞMA:

İnfertilite bir sağlık sorunu olmanın ötesinde hem kişisel hem de sosyal bir problemdir. YÜT, son yıllarda infertilite tedavisinde giderek daha yaygın uygulanmasına rağmen, birçok deneyimli merkezde bile canlı doğum oranı % 45'in altındadır (24, 91-93, 108-113).

20. Yüzyıldan beri infertilite sorununu çözmek için çeşitli yöntemler kullanılır (10). Bunlar; ilaçlar (örn. Androjenler, Gonadotropinler, Antiöstrojenler), cerrahi yöntemler (örn. Varikoselektomi, Vasovasostomi, Vasoepididimostomi) ve YÜT [örn. GIFT (Gamet Intra Fallopian transfer) – ZIFT (Zigot Intra Fallopain transfer) – IUI (Intra Uterin İnseminasyon) – IVF (In Vitro Fertilizasyon)] dir (9-12). Bu yöntemlere rağmen yine de kesin ve yeterli bir başarı sağlanamamıştır (11).

Araştırmacılar bugüne kadar infertilite sorununu başarılı ve aynı zamanda düşük maliyetli çözmek için farklı yöntemler denemişlerdir. Bu araştırmalarda deney hayvanlarına standart modeller, makroskobik, mikroskobik ve moleküler denemeler, değişik medyumlar ve ilaçlar uygulanmışlardır.(119). Hücre kültürü ve üreme hakkında çeşitli çalışmalar devam etmektedir (11- 16, 24, 47, 66, 78, 96-101, 107-113, 114- 120).

İn-vitro koşullarda bazı faktörlerin ve bilinmeyen sebeplerin infertilite tedavisini etkilediği gösterilmiştir (47, 96).

Bugüne kadar granüloza hücrelerinin ve hormonların oosit gelişiminde ve olgunlaşmasında etkisinin çok olduğu açıklanmıştır ve bunlara benzer faktörler oosit seçiminde önemli sayılır (11).

Lanzendorf ve ark., Hamster'in oositine bir sperm enjeksiyonu sonrası çekirdeğinin yoğunluğunun azaldığını, spermlerin %90'ında akrozom reaksiyonu olduğunu rapor etmişlerdir. 1988 yılında Lanzendorf ve ark., bir diğer araştırma grubuyla insanda %30 fertilizasyon oranı bildirmişlerdir. Dolayısıyla enjeksiyondan sonra çok sayıda dejenere oosit olduğu rapor edilmiştir (13).

Fertilizasyonun esas moleküler faktörlere ve karşılıklı uygun elektriksel potansiyele dayanır (74, 84).

Son derece hassas bir yöntem olan EIS yöntemi ile her hücrenin özel parametreleri elde edilebilir (37, 50, 123-125).

2007 yılında, La Belle T. ve ark., tarafından EIS izleme dayalı bir biyosensör sitokin, interlökin-12 (IL-12) 'de tarif edilmiştir (40)

2007 yılında, Yun Y.H., ve ark., son derece uyumlu, duvarı kuleler şeklinde, çok katlı karbon nanotüpler hazırlamışlar.

Empedans ölçümü için bu nanotüplerin içine akışkan kanal gömmüşler ve insan prostat kanser hücrelerinin (LNCaP) tedavisinde kullanmışlar, olumlu sonuçlar almışlardır (126).

Yun Y.H., ve ark., diğer bir araştırmalarında non-invaziv biyoelektrik empedansı, hücre-yüzey arasında uygulamışlar ve apoptoz-kaynaklı insan kolon kanseri değişikliklerini izlemişlerdir(127).

EIS yöntemi insanın vücut ölçülerinden bireysel DNA ölçülerine kadar geniş alanlarda kullanılmıştır (43, 77, 44, 128-140).

Biyolojik sistemlerde akımı sağlayan bileşenlerin, vücut dokuları, hücre içi ve hücre dışı sıvılar gibi iletken bir çözelti içerisinde hareket eden yüklü potasyum (K^+), klor (Cl^-), sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{++}) iyonları olduğu rapor edilmiştir. (Hodgkin,1937) (141-148).

YÜT' lerde kullanılan ortamlar hücre fizyolojisine uygun seçilmiştir. Oosit normalde kas ya da nöron gibi aksiyon potansiyeline sahip bir hücre değildir. Az pompalı kanallar membranda az bulunması gerekir. Buna rağmen tüm uyarılabilen hücrelerin özelliklerine sahiptir.

Bu çalışmada olgun, uygun ve sağlam oosit seçimi EIS ile planlandı. Hazırlanan mikoçip üzerinde oositlerin EIS'i ölçüldü.

Karşılaştırma amaçlı olarak olgun sayılmayan oositlere de EIS ile ölçüm yapıldı. Potansiyostat analiz programına göre, EIS potansiyeli 100 mV'ten yukarı olanlar FEPW'ne dahil edildiler.

Fertilizasyon oranı, embriyo transfer oranı, EIS ölçümleri, ohm kavramı ve kapasitörlerin elektriksel davranışlarına göre Wistar suşu olan ratlar için oositin uygun fertilizasyon EIS penceresi 118 - 132 mV arasında belirlendi.

Optimal EIS penceresi 122-124 mV bulundu.

Oosit canlı bir hücre olduğu için kolayca çevreden etkilenebilir. Çalışmanın diğer bir amacı; hücreye zarar vermeden ve sadece doğal yollardan müdahale ederek az zamanda, maliyeti düşük bir fertilizasyon gerçekleştirmektir. EIS ölçümü kullanarak bu amaca olabildiğince ulaşılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

Bizim çalışmamızda ilk olarak oosit için (FEPW) kullanıldı.

İlk kez Wistar suşu ratların oositleri için EIS potansiyel penceresi 118 ile 132 mV arasında belirlendi. Optimal EIS potansiyel penceresi 122-124 mV bulundu.

Embriyo transfer başarı oranı uygun, olgun ve sağlam oosit seçimi nedeniyle % 51.72'den %92.98'e yükseldi.

Farklı mikroçipler hazırlayarak klinik uygulamalara kesin katkısı olacağını düşünmekteyiz.

Tüp bebek merkezlerindeki zamanın ve maliyetin tasarrufuna önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Aynı uygulama aşağıdaki konulara da önerilebilir:

- Bu çalışmadaki gibi aynı işlem IVF de yapılabilir.
- Embriyo seçimi,
- Sperm dondurulması,
- Kök hücre seçimi,
- Transgenetik hayvanların üretiminde,
- Doku mühendisliğinde,
- İlaç deneyiminde
- Özellikle patolojik durumlarda acil teşhis için
- Tüp bebek merkezlerinde fazla oositlerin üzerinde ilk denemeler için
- Kök hücre ile zigotun FEPW karşılaştırması ve bir "Parametrik Tablo" çizilmesi için
- Özet olarak sitolojide hücrenin biyofizik özellikleri ölçülebilmesi için.

7. **KAYNAKLAR:**

1. Moore Keith L., Persaud T. V. N., The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 8th Edition, chapter (1, 2, 12).
2. Longmans T.W., Medical Embryology (11th Edition), ISBN-13: 978 0781790697 chapter (1, 2, 14).
3. Klosterman l., The amazing human body. Reproductive system. ISBN 978-0-7614-4490-9., 2010, Chapter (1-5).
4. Richard E. Jones, Kristin H. Lopez, Human Reproductive Biology, 3th Edition, Chapter (2 - 6, 9, 16).
5. Larios Merchant H., Diaz-Hernandez V., Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis, ISBN: 978-81-7895-506-3 Editor: Jesus Chimal-Monroy, 4. Gonadal development, 2011, P (75-91).
6. Shrivastav P., Nadkarni P., Wensvoort S., Percutaneous Epididymal Sperm Aspirations for obstructive azoospermia. Hum. reprod, 1994, P (2058-9
7. (6)Ross Michael H., Pawlina W., HISTOLOGY A Text and Atlas, Sixth Edition, Chapter (20- 23).
8. Bormann L. C., Alagretti R. J., da Motta L.A. E., Serafini P., and Smith D. G., 2010, Preparation and Selection of Sperm for IVF and ICSI, Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice, Chapter 38:P (579-590).
9. Lo B., Chou V., A.B., Taylo N. R., Cedars I. M., Wagner M R., and etal., 2004, Informed consent in human oocyte, embryo, and embryonic stem cell research, Fertility and Sterility, VOL. 82, NO. 3,P (559-563).
10. Dohle G.R., Weidner W., Jungwirth A., G. Colpi, Papp G., Pomerol J., Hargreave T.B., 1992, Eau, İnfertilite kilavuzu, Chapter (2,3,5,10,11).
11. Machtinge R., Politch A. J., ornstein D. H.M., Ginsburg S. E., A giant oocyte in a cohort of retrieved oocytes: does it have any effect on the in vitro fertilization cycle outcome?, Fertility and Sterility, Vol. 95, No:2, 2011, P (574-577).

12. Lanzendorf SE., Mayer JE., Swanson J., The fertilizing potential of human spermatozoa following microinjection into hamster oocytes (Abstract). Presented at the Vth world congress on in vitro fertilization and Embryo transfer, Norfolk, VA April-5-10, 1987. Published by the international federation of fertility and sterility society in preliminary program, p 65.
13. Machtinger R., Politch J. A., Hornstein M. D., Ginsburg E. S., and et al., Fertility and Sterility, 2011, A giant oocyte in a cohort of retrieved oocytes: does it have any effect on the in vitro fertilization cycle outcome?, Vol. 95, No. 2, P (573-576).
14. Gökçimen A., Temel S., 2004, İmplantasyon ve moleküler etkileşimler, S.D.Ü. Tüp Fak. Derg. 2004; 11 (4), P (25-33).
15. Park J.Y., Kwon S. H., Park J. W., Park S.M., 2008, Label-free detection of DNA molecules on the dendron based self-assembled monolayer by electrochemical impedance spectroscopy, *analytica chimica acta*, 619 (2008), P (37–42).
16. Karimi S. R., Hatefi M. A., Zamiri N., A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor, *Bio electrochemistry*, 69, (2006) P (201–208).
17. Ito T., Hosokawa K., Maeda M., Detection of single-base mismatch at distal end of DNA duplex by electrochemical impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007), P (1816–1819).
18. Shier d., Butler j., Lewis r., Hole's essentials of human anatomy and Physiology, 11 Edition, Unit 6, Chapter 19.
19. Chung K. W., Chung H. M., Gross Anatomy, Seventh Edition, Chapter 6.
20. Bauman R., Dutton S., Human anatomy and physiology, laboratory textbook ISBN 1-878045-06-7, Chapter (36-37).
21. Fen H., Dauber W., Pocket Atlas of Human Anatomy, 4th Spanish edition 2000, Chapter 7.
22. Barrett K. E., Boitano S., Barman M. S., Brooks L. H., 2010, Ganong's Review of Medical Physiology, 23 th Edition, Chapter (1, 2, 4, 5, 9, 14, 18, 25, 39).

23. Demir R., 2007, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Bölüm (22- 24).
24. Telli O., Yaman Ö., adalafil ve spermatogenez: Literatürün gözden geçirilmesi, erkek üreme sağlığı, P (132-134).
25. Michelle F. S., Catherine M. Bentley., Carolynne T. M., Setting Up a New Cell Culture Laboratory, Methods in Biotechnology, Vol. 8: Animal Cell Biotechnology, P(3-9).
26. (26)Delilbaşı L., 2008, in-vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri, ISBN: 978-975-277-169-7, Bölüm (1-19).
27. Tavmergen-G., Yardımla üreme tekniklerinde başarıyı etkileyen faktörler. İnfertilite. P (213-218).
28. Tıraş MB., Aybar F., İnvitro Fertilizasyon-İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu. J Surg Med Sci, 2006; 2 (5):P (37-41).
29. Kılı Uç RA. Çukurova Üniversitesine Başvuran İnfertil Çiftlerde İn Vitro Fertilizasyon Endikasyonları. Uzmanlık Tezi, T.C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Adana, 2007.
30. Dey SK., Das SK., Reese J., Paria BC., and et al., Molecular cues to implantation. Endocr Rev 2004, 25: P (341-73).
31. Susan JK, Molecular Interactions at the Maternal- Embryonic Interface during the Early Phase of Implantation. Sem Reproductive Med. 2000; 18 (3): P (237 253).
32. Thathiah A and Carson DD. MT1-MMP mediate MUC1 shedding independent of Tace/Adam17. Biochem J, 2004, 382: P (363-373).
33. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. Human Reproduction Update, 2005; 11: P (613-630).
34. Wang J., 2007, Analytical Electrochemistry, 3th Edition, P (42, 58, 84,115).
35. Chang Y. B., Park S. M., Electrochemical Impedance Spectroscopy, Annu. Rev. Anal. Chem. 2010. 3: P (207–29).

36. Macdonald D. D., A Brief History of Electrochemical Impedance Spectroscopy, Center for Electrochemical Science and Technology Pennsylvania State University University Park, PA 16802.
37. Mustafa K., Pan J., Wroblewski J., Leygraf C., and et al., Electrochemical impedance spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy analysis of titanium surfaces cultured with osteoblast-like cells derived from human mandibular bone. *Journal of biomedical materials research* 2002,59: P (655- 664).
38. Dheilly A., Linossier I., Darchen A., Hadjiev D., Monitoring of microbial adhesion and biofilm growth using electrochemical impedancemetry, 2008.
39. Guava technologies Inc., Guava via Count, The new standard for cell counting and viability assessment, www.guavatechnologies.com.
40. La Belle T. J., Bhavsar K., Fairchild A., Das A., and et al., A cytokine immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (2007), P (428–431).
41. Gamry Instruments, Inc., 2011, Series G 300TM and Series G 750TM Potentiostat / Galvanostat / ZRA Quick-Start Guide.
42. Orazem M., Tribollet B., 2008, *Electrochemical impedance spectroscopy*, ISBN 978-0-470-04140-6, P (49, 76, 90, 95,102,103,199).
43. Sverre G., Orjan M., 2000, *Bio impedance and Bioelectricity: Basic* (New York: Academic).
44. Kissinger P. T., Heineman W. R., 1996, *Laboratory Techniques in Electro analytical Chemistry* 2nd edi., rev. and expanded (New York: Dekker).
45. Gamry Instruments, Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy, <http://www.gamry.com>, Application note.
46. Scharfetter H., Merwa R., 2007, 13th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 8th Conference on Electrical Impedance Tomography 2007. ISBN-13: 978-3-540-73840-4 Springer Berlin Heidelberg New York, Theory and Modeling, Chapter (8, 12,16,20,28).

47. Huang H., Liu Z., Yang X., 2006, Application of electrochemical impedance spectroscopy for monitoring allergen–antibody reactions using gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method, *Analytical Biochemistry* 356 (2006), P (208–214).
48. Zheludkevich M.L., Yasakau K.A., Bastos A.C., Karavai O.V., Ferreira M.G.S., 2007, On the application of electrochemical impedance spectroscopy to study the self-healing properties of protective coatings, *Electrochemistry Communications* 9 (2007), P (2622–2628).
49. Nandakumar V., La Belle J. T., Reed J., Shah M., Cochran D., Joshi L., 2008 , A methodology for rapid detection of *Salmonella typhimurium* using label-free electrochemical impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) P (1039–1042).
50. Magjarevic P., Nagel JH., 13th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 8th Conference on Electrical Impedance Tomography 2007.
51. İde T., Mülazımoğlu B., 2008, Ratlarda Bakım ve Beslenme, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, P (45-47).
52. Polk J. B., Stelzenmuller A., Mijares G., and et al. Ag/AgCl microelectrodes with improved stability for microfluidics, *Sensors and Actuators B* 114 (2006) P;(239–247).
53. Paul a J., Brewer J. R., Richard J.C. Brewera L., 2012, An improved approach for fabricating Ag/AgCl reference electrodes, *Electrochimica Acta* 71 (2012) P: (252–257).
54. Mehmet Soylu S., 2010, *Rat Fizyolojisi*, P (22-25).
55. Russell Westwood F., 2008, *The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging, Toxicologic Pathology*, P (374-384).
56. Güney Saruhan B., Aydın Ketani M., 2005, Ovarektomi Yapılan Sıçanlara Ekzojen Verilen Östrojenin Uterus Bağ ve Kas Dokularına Etkilerinin Araştırılması, *Dicle Tıp Dergisi*, 2005, Cilt:32, Sayı:2, P (52-56).
57. Bağış H., 2008, Transgenik Rodent Üretimi, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, P (80-85).

58. Patrick E. S., 1998, A Volume, The Laboratory Animal Pocket Reference Series. The Laboratory Rat. CRC Press, Boca Raton Boston London New York Washington, D.C -1998.
59. Eroğlu F., Erol Eroğlu H., 2010, Ratlarda Analjezi ve Anestezi, Journal of Clinical and Analytical Medicine, P (52-59).
60. Toyoda Y., Chang M. C., 1974, Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer, J. Repord Fert. 1974 (36), P (9-22).
61. Kinked G. J., 2000, The hand book of experimental animals. The laboratory Rat. Chapter (9, 13).
62. Vieira M., Glina S., 2009, Sperm retrieval techniques in azoospermic patients: PESA, MESA, TESA, TESE and MICROTESE, Einstein. 2009; 7 (4 Pt 1): P (532-534).
63. ASCH H. R., SILBER J. S., Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration and Assisted Reproductive Techniques, Annals new york academy of sciences, P (101-110).
64. Nisari M., Ülger H., 2010, The Embryo Culture Techniques, Saglik Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 19 (3), P (216-225).
65. CINCIK M., 2003, Sperm kriyoprezervasyonu, Gülhane Tıp Dergisi 45 (1): P (100 - 106).
66. Liu Q. C., Chen T. E., Huang X. Y., Sun F. Z., 2005, Mammalian freeze-dried sperm can maintain their calcium oscillation-inducing ability when microinjected into mouse eggs, Biochemical and Biophysical Research Communications 328: P (824-830).
67. Timurkan H., Paksoy Z., 2008, A different vasectomy technique in rats, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları; 2008, P (57-59).
68. Monoskia M. A., Schiffa J., Lia S. P., Chanc T.K. P., and ea al, 2007, Innovative Single-Armed Suture Technique for Microsurgical Vasoepididymostomy, Urology, Volume 69, Issue 4, April 2007, P (800-804).
69. Kashiwazaki A., Seita Y., Takizawa A., Maedomari N., Ito J., and Serikawa T., 2010, Chapter 22, Techniques for In Vitro and In Vivo Fertilization in the Rat, Rat Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 597, DOI 10.1007/978-1-60327-

389-3_22, © Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC 2010, P (311-322).

70. Kadioğlu A., Ander H., Akdağ C., Tellaloğlu S., 1993, Vasovasostomide kullanılan mikrocerrahi tekniklerin karşılaştırılması, türk uroloji Dergisi, cilt: 19, Sayı: 2, P (210-217).
71. Monoski Mara A., Schiff J., Li S. P., Chan T. K. P., and Goldstein M., 2007, Innovative Single-Armed Suture Technique for Microsurgical Vasoepididymostomy, Basic Science, and UROLOGY 69: P (800–804).
72. Said S., Han M.-S., Niwa K., Development of rat oocytes following intracytoplasmic injection of sperm heads isolated from testicular and epididymal spermatozoa. Theriogenology, 60 (2003) P (359–369).
73. Lanzendorf SE., Maloney M., Ackerman S., Fertilizing potential of acrosome defective sperm following microsurgical injection into eggs. Gamete res, 1988a, 329: 19.
74. Rezazadeh v. M., Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI), ISBN: 964-7203-47-0 Royan Institute, 2009, chapter (3, 5, 7).
75. Obai G., Aslan S., Kaymaz M., 2001, Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vaginal sitolojinin kullanılması, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 48, P (51-57).
76. Printzen S. I., Zumbé J., Bispink L. Palm S., 2000, Microsurgical epididymal sperm aspiration: aspirate analysis and straws available after cryopreservation in patients with non-reconstructable obstructive azoospermia, Human Reproduction vol. 15 no. 12, P (2531-2535).
77. Wightman M .W., 1998 Voltammetry with microscopic electrodes in the new domains Science, 240: P (415– 420).
78. Hwang L. J., Lin Y.H., Tsai Y.L., In Vitro Maturation and Fertilization of immature oocytes: Comparative Study of Fertilization Techniques, Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Vol. 17, No. 1, 2000, P (39-43).
79. Tesarik J., Mendoza C., 2003, Using the Male Gamete for Assisted Reproduction: Past, Present, and Future, Journal of Andrology, Vol. 24, No. 3: P (317-328).

80. Ebner T., Moser M., Tews G.,2004, Intracytoplasmic Sperm Injection in Zona-free Oocytes, J Turkish German Gynecol ASSOC, Vol. 5 (4); P (294-298).
81. Kyüz B., Demiral O. Ö., Abay M., Üstüner B.,2011, Sığırlarda Swim-Up Yöntemi ile Sperma Separasyonunun Embriyo Cinsiyet Oranına Etkisi,Erciyes Üniv Vet Fak Derg 8 (3): P (165-172).
82. Tesartk J., Greco E., Mendoza C.,2001, Assisted reproduction with in-vitro-cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study, Human Reproduction Vol. 16, No. 12, P (2640-2645).
83. Pope C.E., Johnson C.A., McRae M.A., Keller G.L., 1998, Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes,Animal Reproduction Science 53, 1998, P (221–236).
84. Larsen J. W., Human Embryology Second Edition, ISBN 0-443-07989-7, Chapter 2.
85. Lanzendorf SE., Maloney MK., Nagy Z., Veeck LL., A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. Fertil Steril, 1988b, 835:49p.
86. Silber SJ., Ord T., Balmaceda J., Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. N Engl J med, 323, P (1788-1990).
87. Silber SJ., Nagy ZP., Liu J., Conventional in vitro fertilization versus intra cytoplasmic 461994.
88. Shrivastav P., Nadkarni P., Wensvoort S., percutaneous epididymal sperm aspirations for obstructive azoospermia. Hum. reprod, 1994, P (2058-9).
89. Ben-David U., Kopper O., Benvenisty N., 2012, Expanding the Boundaries of Embryonic Stem Cells, Cell Stem Cell,Volume 10,Number 6,Fifth Anniversary Issue, P (666-677).
90. Wang W., Tang Y., Ni L., Jongwutiwes T., and etal, 2012, A modified protocol for in vitro maturation of mouse oocytes from secondary preantral follicles,Advances in Bioscience and Biotechnology, 2012, 3, P (57-74).

91. Tesarik J., Mendoza C., 2000, In vitro fertilization by intracytoplasmic injection, *Bio, Essays* 21, P (791–801).
92. SPOC 1 Media “ Rat Media ” and Cell Culturing, 2010, <http://www.med.unc.edu/cfpulmcenter/files/SPOC%20Media.pdf/at.../file>.
93. Uehara T., Yanagimachi R., Microsurgical injection of spermatozoa into Hamsters eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclear. *Biology of reproduction*, 1976, P (467-475).
94. Mojtaba RV., Movahedine M., Salehnia M., *Experimental Embryology Technique*. Deputy of research, school of Medical Sciences, Tarbiat Modarres university, 2003, ISBN: 964- 7539- 03- 7, P (20-35).
95. Walton A. E., Armstrong D. T., Oocyte normality after superovulation in immature rats, *J. Repord Fert.* 1983 (67), P (309-314).
96. Ornoy A., Yacobi S., Yaffee P., A simple method of culture of 11.5-day-old rat embryos in DMEM/F12 and 20% fetal bovine serum,. *Anat.*, Blackwell Publishing Ltd., (2003) ,203: P (419–423).
97. Niwa K., Chang M. C., Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture, *J. Reprod. Fert.* (1975) 43, P (435-451).
98. Han S.M., Niwa K., Kasai M., In- Vivo Development of Vitrified Rat Embryos: Effects of Timing and Sites of Transfer to Recipient Females, *Biology of Reproduction*, (2004),70, P (425–429).
99. Oh h.-H., Miyoshi K., Funahashi H., Rat Oocytes Fertilized in Modified Rat 1-Cell Embryo Culture Medium Containing a High Sodium Chloride Concentration and Bovine Serum Albumin Maintain Developmental Ability to the Blastocyst Stage, *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, (1998), 59: P (884–889).
100. Seita A., Sugio S., Ito J., Kashiwazak N., Generation of Live Rats Produced by In Vitro Fertilization Using Cryopreserved Spermatozoa, *Biology of Reproduction*,80, (2009) P (503–510).

101. Seita Y., Fujiwara K., Takizawa A., Furukawa K., Full-term development of rats from oocytes fertilized in vitro using cryopreserved ejaculated sperm, *Cryobiology*, 2011, 63: p (7-11).
102. Printzen S., Zumbé J., Bispink L., Palm St.,and et al.,Microsurgical epididymal sperm aspiration: aspirate analysis and straws available after cryopreservation in patients with non-reconstructable obstructive azoospermia, *Human Reproduction*, 2000, vol.15, no.12,. P (2531-2535).
103. Kim N.H., Shin J.S., Kim C., Jun S.H., and et al., Fertilization and in vitro development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei, *Theriogenology* ,199951: P (1441-1449).
104. Miyata T., Ito M., Shimoï G., Fujita Y., 2007. Effect of Oocyte Preincubation and Intra-Ovarian Bursa Transfer on the Development of Oocytes Following Intracytoplasmic Sperm Injection in Rats,*J. Mamm. Ova Res. Vol. 24. P (29-34).*
105. Baflar M., Türker M., İrez T., Arda O., 2008, Süperovulasyon Protokolünde Kullanılan GnRHAgonistinin Oosit Olgunluğu ve Çapına Etkileri,*Cerrahpafla Tıp Dergisi* 2008; 39 (2): P (41-48).
106. Palermo G., Joris H., Devroey P., Pregnancies after intra cytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lanvet*, 1992, 340:17.
107. Stoop D., Ermini B., Polyzos N.P., Haentjens P., Reproductive potential of a metaphase II oocyte retrieved after ovarian stimulation: an analysis of 23 354 ICSI cycles, *Human Reproduction*, Vol.27, 2012, No.7, P (2030–2035).
108. Bonduelle M., Mannaerts B., Leader A., 2011, Prospective follow-up of 838 fetuses conceived after ovarian stimulation with corifollitropin alfa: comparative and overall neonatal outcome,*Human Reproduction*, Vol.27, No.7 pp. P (2177–2185).
109. LMENSEE K.,Cloning in Reproductive Medicine,*Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 18, No. 8, 2001.
110. Hutchinson L. J, Rajagopal P S., Sales J. K., Jabbour N. H.,Molecular regulators of resolution of inflammation: potentialtherapeutic targets in the reproductive system,*Reproduction* (2011) 142 P (15–28).

111. Fatehi A.N., Zeinstra E.C., Kooij R.V., Colenbrander B., and et al, Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate, *Therioencology*, 2002, 57: P (1347-1355).
112. Wehrenberg W. B., Kurt K. J., Hutz R. J., Effects of equine chorionic gonadotropin on reproductive performance in anestrous mink. *J. Anim. Sci.* 1992. 70: P (499-502).
113. Berger T., Horner M. C., In vivo exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality, *Reproductive Toxicology* 17 (2003) P (273–281).
114. Garifallou G. Z., Tsekenis G., Davis F., Millner A. P., and et al., Labelless Immunosensor Assay for Fluoroquinolone Antibiotics based upon an AC Impedance Protocol, *Analytical Letters*, 2007, 40 (7), P (1412-1442).
115. Waal d. E., Yamazaki Y., Ingale P., Marisa S. B., and et al., Gonadotropin stimulation contributes to an increased incidence of epimutations in ICSI-derived mice, *Human Molecular Genetics*, 2012, P (1–13).
116. Pope C.E., Johnson C.A., McRae M.A., Keller G.L., Development of embryos produced by intra cytoplasmic sperm injection of cat oocytes, *Animal Reproduction Science*, 53, 1998, P (221–236).
117. OK E., SPERMATOGENESIS AND FERTILIZATION IN ELDERLY MEN, *Turkish Journal of Geriatrics*, 2008; 11 (4): P (204-207).
118. Aktan T. M., Cüce G., Duman S., Aksoy E., Görkemli H., Effect of Sperm Preparation Techniques on Fertilization, *elçuk Üniv Tıp Derg* 2011; 27 (4): P (205-207).
119. Manohar K. A., Bretschger O., Nealson H. K., Mansfeld F., The use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the evaluation of the electrochemical properties of a microbial fuel cell, *Bioelectrochemistry* 72 (2008) P (149–154).
120. Nandakumar V., La Belle T. J., Reed J., Shah M., Cochran D., and et al., A methodology for rapid detection of *Salmonella typhimurium* using label-free electrochemical impedance spectroscopy, *Sensors and Bioelectronics* 24 (2008) P (1039–1042).

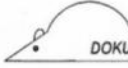
121. Kim N.H., Shin J.S., Kim C., Jun S.H., and et al., fertilization and in vitro development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei, *Theriogenology*, 1999; 51: P (1441-1449).
122. Printzen S., Zumbé J., Bispink L., Palm St., and et al., Microsurgical epididymal sperm aspiration: aspirate analysis and straws available after cryopreservation in patients with non-reconstructable obstructive azoospermia, *Human Reproduction*, 2000, vol.15, no.12, P (2531-2535).
123. Andreescu S., Sadik OA., McGee DW., Autonomous multi electrode system for monitoring the interactions of iso flavonoids with lung cancer cells. *Anal Chem*, 2004, 76: P (2321-2330).
124. Du D., Cai J., Ju H., Yan F., and et al., Construction of a biomimetic zwitter ionic interface for monitoring cell proliferation and apoptosis, *Langmuir*, 2005, 21: P (8394 - 8399).
125. Garcia MC A., Saldana L., Alonso C., Barranco V., and et al., In situ cell culture monitoring on a Ti-6Al-4V surface by electrochemical techniques. *Acta biomaterialia*, 2009, 5: P (1374- 1384).
126. Yun Y. H., 2007, A Nanotube array immunosensor for direct electrochemical detection of antigen-antibody binding *Sensors Actuators, B*, 123: P (177-182).
127. Yin H., Wang L. F., Wang L. A., Cheng J., Bioelectrical impedance assay to monitor changes in aspirin-treated human colon cancer HT-29 cell shape during apoptosis, *Analytical Letters*, Volume 40, Issue 1, 2007.
128. Sohn L. L., Saleh O. A., Facer G. R., Beavis A. J., and et al., 2000, Capacitance cytometry: measuring biological cells one by one *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997 , P (10687-10690).
129. Yun Y. H., Shanov V., Tu Y., Schulz M. J., Yarmolenko S., and et al., 2006, A multi wall carbon nanotube tower electrochemical actuator *Nano Lett.* 6: P (689-693).
130. Li J., Ng H. T., Cassell A., Fan W., 2003, Carbon nanotube nanoelectrode array for ultrasensitive DNA detection *Nano Lett.* 3: P (597-602).

131. Koehne J., Chen H., Li J., Cassell A. M., and et al., 2003, Ultrasensitive label-free DNA analysis using an electronic chip based on carbon nanotube Nano electrode arrays Nanotechnology 14: P (1239–1245).
132. Hinds B. J., Chopra N., Rantell T., Andrews R., and et al., 2004, Aligned multiwalled carbon nanotube membranes Science 303: P (62–65).
133. Yuzvinsky T. D., Fennimore A. M., Kis A., Zettl A. 2006, Controlled placement of highly aligned carbon nanotubes for the manufacture of arrays of nanoscale torsional actuators, Nanotechnology, 17: P (434–438).
134. Carlo D. D., Wu L. Y., Lee L. P., 200, 6 Dynamic single cell culture array Lab on a Chip, 6: P (1445–1449).
135. Yun Y. H., Shanov V., Tu Y., Subramaniam S and et al., 2006, Growth mechanism of long aligned multi-wall carbon nanotube arrays by water-assisted chemical vapor deposition, J. Phys. Chem. B, 110, 23920.
136. Yun Y.H., Dong Z., Shanov N. V., Schulz J. M., Electrochemical impedance measurement of prostate cancer cells using carbon nanotube array electrodes in a microfluidic channel, Nanotechnology 18 (2007) 465505 (7pp).
137. Schwan H. P., 1957, Advances in biological and medical physics, Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions, vol. 5, (New York: Academic), P (147–209).
138. Gascoyne P. R., Pethig R., Burt J. P., Becker F. F., 1993, Membrane changes accompanying the induced differentiation of friend marine erythroleukemia cells studied by dielectrophoresis Biochim. Biophys. Acta ,1149: P (119–126).
139. Arndt S., Seebach J., Psathaki K., Galla H. J., and et al., 2004, Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis Biosens, Bioelectron, 19: P (583–594).
140. Giaever I., Keese C. R., 1993, A morphological biosensor for mammalian cells , Nature, 366: P (591–592).
141. Hodgkin, A.L. 1937, Evidence for electrical transmission in nerve. J Physiol. 90, P (183–232).

142. Hodgkin, A.L. 1951, The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. *Biol Rev.* 26, P (339-409).
143. Hodgkin, A.L., Huxley A.F. 1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon *Loligo*. *J Physiol.* 116, P (449-472).
144. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. 1952b. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117, P (500-544).
145. Hodgkin, A.L., Keynes R.D. 1953. The mobility and diffusion coefficient of potassium in giant axons from *sepia*. *J Physiol.* 119, P (513-528).
146. Hodgkin, A.L., Keynes R.D. 1955. The potassium permeability of a giant nerve fibre, *J Physiol.* 128, P (61-88).
147. Hodgkin, A.L. 1958. Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibers. *Proc R Soc Lond* 148, P (1-37).
148. Coleman, P.A. and Miller, R.F. 1989, Measurement of passive parameters with whole cell recording from neurons in the intact amphibian retina. *J. Neurophysiol.* 61, P (218-230).

8. **EKLER:**

9.1. **Etik Onayı:**

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234
<http://deu.edu.tr/idenyetik/>

Toplantı No : 14/01/2009
Toplantı Tarihi : 08 Ocak 2010

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

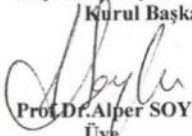
03/2010 Protokol No'lu; Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Ülker SÖNMEZ'in yürütücüsü olduğu "EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) metodunu kullanarak ICSI (İntra Cytoplasmic Sperm Injection) ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması" isimli projede;

- Başvuru formuna "1 doktora öğrenci alınacaktır" olarak eklenmesi,
- Hayvanlar üzerine girişim yapacak proje personeli yeterli tecrübeye sahip midir?
- Deneye alınacak dişi ve erkeklerde kısırlık testleri yapılacak mı?
- Hayvan sayıları sperm ve ovasit elde etme durumuna göre değiştirilerek azaltılması önerilir(Sperm ve ovum elde edilecek gruplar için).

Yukarıda belirtilen eksikliklerin tamamlanmasından sonra projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

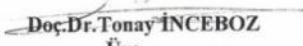
Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı


Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

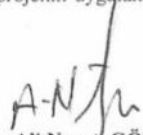
Doç.Dr. Hüseyin ASTARCIOĞLU
Üye (top.katılamadı)

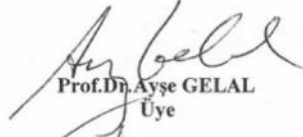
Doç.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye
(top.katılamadı)

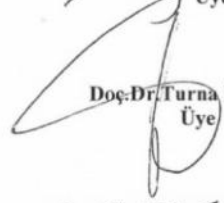

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye

Doç.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

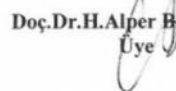
Ayşe Nur BALİN
Üye


Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı


Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye


Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye

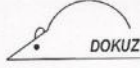

Doç.Dr.A.Hüseyin BASKIN
Üye


Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

9.2. Etik Onayı:



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

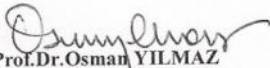
35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234
<http://deu.edu.tr/idenyetik/>

Toplantı No : 03/10/2012
Toplantı Tarihi : 01 Haziran 2012

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

03/2010 Protokol No'lu; Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Ülker SÖNMEZ'in yürütücüsü olduğu "EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) metodunu kullanarak ICSI (İntra Cytoplasmic Sperm Injection) ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması" isimli projede gönderilen belgeler incelenerek bilgi edinilmiştir.

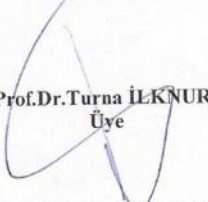
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

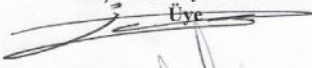

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı

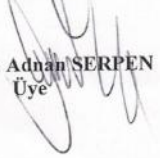
Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye (Topl.katılmadı)

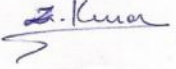

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye(Topl.katılmadı)

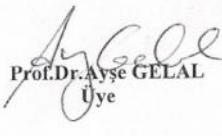

Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye


Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye

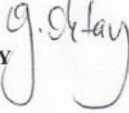

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye

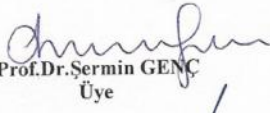

Zehra KINAM
Üye

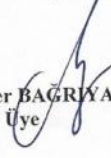

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

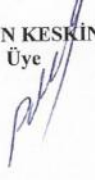

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye


Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye


Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye


Prof.Dr.Şermin GENÇ
Üye


Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye


Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

10. ÖZGEÇMİŞ:

Mostafa ASHRAFI OSALOU

TC Kimlik No / Pasaport No:	99055281908
Doğum Yılı:	1976
Yazışma Adresi :	DEÜ- TIP Fak.- Histoloji ve Embriyoloji AD
Telefon :	0090 531 585 2868 – 0098 914 346 9402
Faks :	
e-posta :	maomostafa@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
İRAN	Tarbiat Modares	Sağlık Bilimleri	Medikal Anatomi Bilimleri.		2001-2004
İRAN	Tabriz	Fen Bilimleri	Genel Biyoloji	BC	1994-1998
İRAN	Tabriz - Babol	Veterineri Fakü.	Veterineri	DVM	1992-1998

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kaıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
