

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERM CHİP UYGULAMASININ VE DİĞER
SPERM AYRIŞTIRMA YÖNTEMLERİNİN IVF
BAŞARISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin İSKEFİYELİ

Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi ÖZCAN BUDAK

OCAK-2022

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPERM CHİP UYGULAMASININ VE DİĞER
SPERM AYRIŞTIRMA YÖNTEMLERİNİN IVF
BAŞARISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin İSKEFİYELİ

Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

**Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Emriyoloji “Bu tez .../.../2022 tarihinde
aşağıdaki jüri tarafından Oy birliği/ Oy çokluğu ile kabul edilmiştir.”**

JÜRİ ÜYESİ	KANAATİ	İMZA

BEYAN

Bu alışma T.C. Sakarya Üniversitesi Rektrlğ Tıp Fakültesi Dekanlığ Etik Kurulu'ndan 333 sayılı 30/06/2021 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

31/12/2021

Yasemin İSKEFİYELİ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamın başından sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında yardım ve desteklerini aldığım, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yaralandığım, Tüp Bebek Merkezi Androloji ve Embriyoloji laboratuvarında teorik ve pratik bilgilerini benimle paylaşıp her zaman destek olan danışman hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Özcan BUDAK’a, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve fikirlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Elvan ŞAHİN ve Prof. Dr. Nureddin CENGİZ’e, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda yanımda olup, desteklerini benden hiç esirgemeyen sevgili aileme ve en değerlim oğlum Alperen İSKEFİYELİ’ ye gönülden teşekkür ve minneti borç bilirim.

Saygılarımla,
Yasemin İSKEFİYELİ

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMA VE SİMGELER.....	ix
TABLOLAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İNFERTİLİTE GİRİŞ.....	4
2.2. İNFERTİLİTE NEDENLERİ.....	5
2.2.1. Kadın İnfertilitesi ve Nedenleri.....	5
2.2.2. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri.....	8
2.3. ERKEK ÜREME SİSTEMİ	11
2.3.1. Gonadlar (Testisler)	11
2.3.2. Genital Kanal Sistemi	14
2.3.3. Aksesuar Genital Bezler.....	15
2.3.4. Penis ve Üretra	17
2.4. SPERMATOGENEZ.....	17
2.4.1. Spermatogonial Faz.....	17
2.4.2. Spermatozoid Fazı:.....	17
2.4.3. Spermatid fazı (Spermiogenesis):	18
2.5. SPERMİN YAPISI.....	19
2.6. İNFERTİL ÇİFTLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	20
2.6.1 Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	20

2.6.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	21
2.7. SEMEN TOPLANMASI.....	24
2.7.1. Makroskopik Değerlendirme	25
2.7.2. Mikroskopik Değerlendirme	26
2.9. SPERMİN DNA YAPISI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.10. SPERM DNA HASARI MEKANİZMALARI VE ETHOLOJİLERİ ...	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.11. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ (YÜT)	29
2.11.1. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) :	29
2.11.2. İntrauterin inseminasyon (IUI).....	30
2.11.3. In Vitro Fertilization (IVF) - Embriyo Transferi (ET):.....	30
2.11.4. Gamaet Intra Fallopian Transfer (GIFT):	30
2.11.5. Zigot Intrafallopian Transfer (ZIFT):	31
2.11.6. Tubal Embriyo Transferi (TET):.....	31
2.11.7. Peritoneal Oosit ve Sperm Transferi (POST):	31
2.12. SPERM HAZIRLAMA (YIKAMA) YÖNTEMLERİ.....	31
2.12.1. Sperm Washing (Yıkama):.....	32
2.12.2. Dansite-Gradyent(Yoğunluk) Santrifüj (DGS) Tekniğine Göre Sperm Hazırlanması	33
2.12.3. Swim-up Yöntemi	34
2.12.4. Zeta (Elektrokinetik) Potansiyeli Tekniği.....	34
2.12.5. Manyetik Aktive Sperm Seçimi Tekniği (Magnetic-Activated Cell Sorting System) (MACS):.....	35
2.12.6. Hyaluronik Asit Bağlanma Tekniği	36
2.12.7. Elektroforez Bazlı Sperm Seçimi Tekniği:	36
2.12.8. Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi Tekniği (Motile Sperm Organellar Morphology Examination) (MSOME)	37

2.12.9. Çift Kırılma Tekniği:.....	38
2.12.10. Mikro-akışkan Teknolojiler ve Mikro-akışkanlarla Sperm Hazırlama Teknikleri:	38
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	40
3.1. ETİK KURUL İZNİ	40
3.3. KULLANILAN DENEY EKİPMANLARI	42
3.3.1. Santrüfjü.....	42
3.3.2. Otomatik pipetör	42
3.3.3. Mikroskop	42
3.3.4. Flow Kabin (Steril Kabin).....	42
3.3.5. İnkübatör	42
3.3.6. Konik Tüp	42
3.3.7. Mikro Akışkan Çip.....	42
3.4. SEAH TÜP BEBEK MERKEZİ ANDROLOJİ LABORATUARINDA UYGULANAN SEMEN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	43
3.4.1. Makroskobik Değerlendirme	43
3.4.2. Makler Sayım Çemberinde Semen Mikroskobik Değerlendirilmesi....	43
3.4.3. Konsantrasyon (Dansite) Ölçümü	43
3.4.4. Total Sperm Sayısının Hesaplanması	44
3.4.5. Motilitenin Değerlendirilmesi.....	44
3.5. SEAH TÜP BEBEK MERKEZİ ANDROLOJİ LABORATUARINDA KULLANILAN SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ	44
3.5.1. Swim-Up Yöntemi	44
3.5.2. Mikroakışkan Çip Yöntemi.....	45
3.6. TÜP BEBEK MERKEZİNDE KADINA UYGULANAN IVF/ICSI İŞLEM BASAMAKLARI.....	46
3.6.1. Kontrollü Hiperstimülasyon ve ICSI Prosedürü	46

3.6.2. Yumurta Toplama İşlemi (OPU-Oosit Pick-Up)	46
3.6.3. Oosit Denüdayonu ve Matürasyon Tayini.....	47
3.6.4. Mikroenjeksiyon-ICSI(Intra Cytoplasmic Sperm Injection) İşlemi .. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
3.6.5 Embriyo Kültürü	48
4.BULGULAR	49
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ.....	63
KAYNAKÇA	64
EK 1.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMA VE SİMGELER

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
AOA	: Anti-over antikorları
ART	: Yardımcı üreme teknikleri
ASA	: Anti-sperm antikorları
BMI	: Vücut kitle indeksi
BVI	: Bazal vücut ısısı takibi
°C	: Santigrat
COC	: Korona-kumulus kompleksi
CRP	: Klinik gebelik
CSW	: Konvansiyonel swim-up yöntemi
DFE	: DNA fragmentasyon indeksi
DFI	: DNA hasar oranı
DGS	: Dansite gradiyent santrifüjleme
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSA	: Çift taraflı yapışkan film
DSW	: Direkt swim-up yöntemi
ET	: Embriyo transferi
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GIFT	: Gamet intra fallopian transfer
GnRH	: Gonadotropik hormonlar
HA	: Hyalüronik asit
HCG	: İnsan koryonik gonadotropin
HOS	: Hipo-ozmotik şişme testi
HSG	: Histerosalpingografi
ICSI	: İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu
IMSI	: İntrastoplazmik morfolojisine göre seçilen sperm enjeksiyonu
IUI	: İntrauterin inseminasyon
IVF	: İn vitro fertilizasyon

KAT	: Klamidya antikor testi
LBR	: Canlı doğum oranı
LH	: Lüteinleştirici hormon
MAC	: Mikro-akışkan chip
MACS	: Manyetik aktive sperm seçim tekniği
MAR	: DNA'nın nükleer matrikse bağlanma bölgesi
MIF	: Müller kanalı inhibe edici faktör
MII	: Metafaz-II oosit sayısı
MSOME	: Motil sperm organellerinin morfolojik değerlendirilmesi tekniği
OPU	: Oosit Toplama
PAP	: Prostatik asit fosfataz
PAS	: Periyodik asitSchiff
Ph	: Hidrojen gücü
PICSI	: Fizyolojik intrastoplazmik sperm enjeksiyonu
PKOS	: Polikistik over sendromu
PMMA	: Polimetil metakrilat kombinasyonu
POST	: Peritoneal oosit ve sperm transferi
POY	: Prematür ovaryan yetmezlik
PRL	: Prolaktin hormon
PSA	: Prostat spesifik antijen
PS	: Fosfatidilserin
PVP	: Polivinilpirolidon
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
SEAH	: Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi
SIS	: Sonohisterografi
SU	: Swim-up tekniği
TESE	: Testiküler sperm ekstraksiyonu
TET	: Tubal embriyo transfer
TSH	: Tiroit stimüle edici hormon
TVUSG	: Transvajinal ultrasonografi
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri
ZIFT	: Zigot intra fallopian transfer

WHO	: Dünya sağlık örgütü
XXY	: Klinefelter sendromu
cm	: santimetre
g	: gram
m	: metre
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre



TABLÖLAR

Tablo 1: WHO'nun yapmış olduğu son düzenlemeye göre semen parametreleri analiz referans değeri ;.....	23
Tablo 2: Çalışmada ardışık iki denemede kullanılan total gonadotropin ve sperm parametreleri karşılaştırılması.....	50



ŞEKİLLER

Şekil 1: Gruplar arası oosit ve embriyo değerlerinin karşılaştırılması..... 51



ÖZET

SPERM CHİP UYGULAMASININ VE DİĞER SPERM AYRIŞTIRMA YÖNTEMLERİNİN IVF BAŞARISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

GİRİŞ VE AMAÇ: Tüp bebek tedavilerinde sperm seçme tekniklerinin iyi kalitedeki spermi ayırtmaya yönelik olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, sperm chip uygulamasının ve diğer sperm ayırtma yöntemlerinin IVF başarısı üzerine etkilerini araştırmaktır. Sperm hazırlamada kullanılan swim-up tekniği ile sperm chip tekniğini, fertilize oosit sayıları, kaliteli embriyo sayıları ve gebelik sonuçlarına etkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER: Bu amaçla, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezindeki dosya bilgilerini kullanarak retrospektif bir çalışma yaptık. Sperm hazırlama yöntemlerinin IVF başarısına etkisini araştırırken, swim-up ve sperm chipli 30 kişilik iki ayrı grup değerlendirilmeye alındı. Kadın ve erkek yaşının, kadın ve erkek beden kitle indeksinin (BMI), semen hacminin, toplam ve ileri hareketli sperm sayılarının ve sperm morfolojisinin IVF başarı üzerindeki rollerini de değerlendirdik. Kullanılan yöntemlerin gebelik sayısına oranlarını hesapladık ve hasta verilerini istatistiksel olarak birbiriyle kıyasladık.

BULGULAR: Çalışma Ocak 2019- Ağustos 2020 tarihleri arasında IVF uygulanan 60 infertil olgunun; tedavide kullanılan total gonadotropin miktarı, sperm konsantrasyonu, sperm morfolojisi, total sperm hareket ve progresif sperm hareketleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi($P>0.05$). İki grup arasında toplanan oosit, MII oosit sayıları arasında fark görülmedi. Fertilize oosit, 3., 5.gün iyi kalite embriyo sayıları ile 5.gün dondurulmuş iyi kalite embriyo sayıları arasında anlamlı farklar görüldü. Gruplar arasında implantasyon ve gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmedi($P>0.05$).

SONUÇ: Sperm hazırlama yöntemlerinin IVF başarısına etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bu retrospektif çalışmamızda; MAC tekniğinin erkek faktör

infertilitesi endikasyonlu ART tedavilerinde implantasyon ve gebelik sonuçlarını olumlu şekilde katkı sağlamadığı fakat ICSI sonrası fertilizasyon oranı, kaliteli embriyo sayısı ve dondurulan beşinci gün embriyo sayılarını arttırdığı görüldü.

Anahtar Sözcükler: Yardımcı üreme teknikleri, in vitro fertilizasyon, swim-up, sperm chip, erkek infertilitesi



SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SPERM CHIP APPLICATION AND OTHER SPERM SEPARATION METHODS ON IVF SUCCESS

INTRODUCTION AND AİM: It is known that sperm selection techniques in IVF treatments are aimed at separating good quality sperm. The aim of this study is to investigate the effects of sperm chip application and other sperm separation methods on IVF success. The aim of this study is to investigate the effects of swim-up technique and sperm chip technique used in sperm preparation, the number of fertilized oocytes, the number of quality embryos and pregnancy outcomes.

MATERIALS VE METHODS: For this purpose, we conducted a retrospective study using the file information of Sakarya University Training and Research Hospital IVF Center. While investigating the effect of sperm preparation methods on IVF success, two separate groups of 30 people with swim-up and sperm chips were evaluated. We also evaluated the roles of male and female age, female and male body mass index (BMI), semen volume, total and advanced motile sperm counts, and sperm morphology on IVF success. We calculated the ratio of the methods used to the number of pregnancies and statistically compared the patient data with each other.

RESULTS: The study included 60 infertile cases who underwent IVF between January 2019 and August 2020; there was no statistically significant difference between the total amount of gonadotropin used in the treatment, sperm concentration, sperm morphology, total sperm motility and progressive sperm motility ($P > 0.05$). There was no difference between the collected oocyte and MII oocyte numbers between the two groups. There were significant differences between the numbers of fertilized oocytes, 3rd and 5th day good quality embryos and 5th day frozen good

quality embryos. There were no statistically significant differences in implantation and pregnancy rates between the groups ($P>0.05$).

CONCLUSION: In this retrospective study, which was conducted to investigate the effects of sperm preparation methods on IVF success; it was observed that the MAC technique did not contribute positively to implantation and pregnancy outcomes in ART treatments with male factor infertility indication, but it increased the fertilization rate, the number of quality embryos and the number of frozen fifth-day embryos after ICSI.

Keywords: Assisted reproductive techniques, in vitro fertilization, swim-up, , sperm chips, male infertility.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde her geçen yıl yükselen ve önemli sağlık sorunu olarak karşılaştığımız infertilite, üreme periyodundaki bireylerin yaklaşık %8-12'sini etkilemektedir. İnfertilite 35 yaşın altındaki bireylerde korunmasız 1 yıl, 35 yaş üstü bireylerde ise korunmasız 6 ay boyunca düzenli cinsel müsamabete rağmen gebeliğin oluşmaması durumudur. Aynı zamanda bazı durumlarda hamilelik görülebilir ancak tekrarlayan düşüklerle sonuçlanması da kısırlık olarak adlandırılmaktadır. İnfertilite deki oran; %35-45 erkek kaynaklı, %45-50 kadın kaynaklı ve %15-20 açıklanamayan nedenlerden kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Külahçioğlu, 2012; Yapça, 2010).

İn vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi yapılarak, üreme hücrelerinin laboratuvar ortamında birleştirilip döllenmesi neticesinde oluşan zigotun gelişerek anneye aktarılmasıyla 1978 yılında Louise Brown adı verilen ilk tüp bebek doğmuştur. Buda birçok infertil çiftler için beklenti oluşturarak IVF alanında çeşitli birçok çalışma yapılmasını ve yöntemler geliştirilmesini sağlamıştır. Bu gelişmeyle birlikte günümüzde infertil çiftler yardımıla üreme teknikleri (YÜT-ART) kullanılarak çok daha fazla oranlarda bebek sahibi olabilmesi sağlanmıştır. YÜT'de başarıyı; doğru tedavi yöntemi, yöntemle elverişli laboratuvar uygulamaları, yumurtalık (over-ovulasyon), uterus (rahim-endometrium), fallop tüpleri (tuba uterina açıklığı), erkek üreme hücresi (spermatozoon) ve elverişli zamanla büyük ölçüde etkilemektedir (Güler, 2020).

IVF için geleneksel ve mikroenjeksiyon yöntemleri kullanılabilir. Mikroenjeksiyon yöntemiyle, diğer tekniklere göre son zamanlarda yüksek başarı oranı elde edildiğinden en sık kullanılan YÜT teknikleri arasına girmiştir. Erkek kaynaklı olumsuz sonuçlanan IVF denemelerini yaklaşık %25-50 oranında etkileyen mikroenjeksiyon tekniğinde seçilmiş olan sperm hücresi, döllenmeyi ve zigottan gelişen embriyo kalitesini büyük oranda etkilemektedir (Aydın Deniz, 2017).

YÜT’de semeni işleme uygun hale getirmek için yapılan uygulamaya ‘sperm ayıklama (sperm yıkama-hazırlama) yöntemleri’ olarak tanımlanmaktadır. Sperm hazırlama teknikleri sayesinde seminal plazma ayrıştırılır, semen kontaminasyona neden olabilecek hücre ve etrafındaki döküntülerden uzaklaştırılır, semendeki yabancı maddelerin istenmeyen etkileri yok edilir, reaktif oksijen radikalleri uzaklaştırılır, homojen fertil sperm popülasyonu oluşturulurken biryandan da spermlerin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonları başlatılarak işleme hazır hale getirilir. Bu amaçlara uygun olarak birçok sperm yıkama yöntemi geliştirilmiş olup bunlar arasında en yaygın kullanılan ve etkinliği bilinen yöntemler Swim-up, Dansite Gradient ve Sperm chip’ tir (Yıldız, 2019).

Swim-up yönteminde sperm kendi hareketliliği ile semenden ayrılarak ejakulattaki hareketli sperm sayısının tüm sayıya oranı yüksek ve sperm dışı hücre sayısı düşük ise bu yöntem tercih edilir. Dansite Gradient yöntemi morfolojisi düzgün hareketli spermatozoa ile morfolojisi düzgün olmayan hareketsiz spermatozoa yoğunluğunun ayrı olması ilkesine dayanır. Santrifüj işleminden sonra morfolojisi düzgün spermler en yoğun alt tabakaya göç ederek orada katman oluştururlar. Morfolojisi düzgün olmayan spermler ise üst tabakaya doğru hareket ederek morfolojisi düzgün sağlıklı olanla birbirinden ayrılmış olurlar. Fakat son zamanlarda DNA bozukluğuna ve fragmentasyonuna santrifüjleme işleminin neden olduğu görülmüştür. DNA fragmentasyonuna uğramış bu spermler mikroenjeksiyon tekniğinde kullanıldığında sonuç olarak implantasyonu, fertilizasyonu ve kaliteli embriyo oluşumunu etkilemektedir. Bu sebeple de DNA hasarının minimuma çekilmesi için mikro akışkan çip sperm ayıklama tekniği geliştirilmiştir (Işık, 2019; Dinçel, 2019).

Mikroakışkan çip yönteminde dansite gradient santrifüjleme(DGS) yöntemine göre elde edilen spermatozoaların hareketliliğinin çok daha fazla olduğu, DNA hasar oranının daha az olduğu ayrıca spermelerin daha normal morfolojide olduğu bildirilmiştir. Sperm chip yönteminde in vivo şartlarda olduğu gibi doğal seleksiyona benzer şekilde en yüksek motilitedeki spermeler kanallarda ilerleyerek çıkış noktasına ulaşan kaliteli spermelerin seçilmesini sağlar (Gianaroli L. , et al., 2008).

Ülkemizde sperm hazırlanmasında kullanılan iki tip mikro-akışkan çip bulunmaktadır. Bunlardan ilki İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) için geliştirilmiş kanallardan oluşan yatay bir platformda spermelerin yözdürölerek karşı tarafa ilerlemeleri neticesinde yüksek motiliteye sahip kaliteli spermelerin ayıklanmasını sağlamaktadır. Motilitesi iyi ve doğrusal yönde olan kaliteli spermeler karşı tarafa bu şekilde geçerek ayrıştırılmış olurlar. Fakat az sperm konsantrasyonu var ise santrüfjlemeyle ön yıkama yapılarak sonunda yeterli az sayıda sperm sayısına ulaşılır. Bunlardan ikincisi ise aşılama (IUI) için üretilmiştir. Bu uygulama için orta kısımda bulunan delikli membran filtreden düzgün morfolojideki spermelerin geçişine izin vererek spermelerin aşağıdan yukarıya doğru yözdürölmesi sağlanır. Bu çip yönteminde santrüfjleme işlemi yapılmaz çünkü büyük hacimdeki yükleme kısmına çok miktarda yükleme yapılarak spermeler kendi hareketiyle karşı tarafta çok sayıda sperme ulaşılır ve işlem için toplanırlar (Yıldız, 2019).

Bu çalışmanın amacı sperm yıkamada en sık kullanılan yöntemler olan swim-up ve sperm chip yöntemlerinin fertilize oosit sayıları, kaliteli embriyo sayıları ve gebelik sonuçlarına etkisini araştırmak için 30 kişilik iki ayrı gruba ayrılmış hastalarda karşılaştırılacaktır. Sonuç değerlendirilip sperm chip tekniğinin IVF tedavilerine katkı sağlayıp sağlamadığını inceleyeceğiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO, DSÖ) kriterlerine göre infertilite (kısırlık) , çiftlerin henüz tıbbi yada fiziksel muayene bulgularına göre değerlendirme yapılmadan önce düzenli(haftada 3-4 defa) ve korunmadan yapılan cinsel münasebetlere rağmen en az 12 ay ve daha fazla süre boyunca gebeliğin oluşmaması durumudur. Yaş ortalaması 35 yaşın üstüne çıktığı kişilerde sağlıklı beslenmeye rağmen bu süre 6 aya indirilebilir. Daha önceden gebeliğin hiç oluşmadığı bu duruma primer infertilite adı verilir. Ayrıca kadın gebe kalıyor fakat kısa süre içinde düşük yapıyorsa veya kadın gebe kalmış sonrasında tekrarlayan düşüklerle gebeliğin oluşmaması da infertilitenin kapsamındadır. Bu durumda canlı doğumla oluşsun yada oluşmasın bir gebelik gerçekleşmişse sekonder infertilite adı verilir. Sekonder infertil sayısının ülkemizde 14–50 yaş aralığındaki kadınların yaklaşık %18'sinin olduğu düşünülmektedir (Çapar, 1990).

Sterilite; infertil hasta grubunun küçük bir kısmını oluşturur ve çocuk sahibi olma yetisinin olmaması olarak tanımlar. Fekundabilite; bir menstrual siklüste gebeliğin oluşabilme olasılığı, fekundite; ise bir siklüste gebeliğin canlı doğumla sonuçlanabilme olasılığıdır (Gedik Mutlu, 2012; Yılmaz Şahin, 2012).

Genç sağlıklı eşlerin doğal yollardan yaklaşık %86'sında ilk sene içinde, %90'ında ilk iki sene içerisinde gebelik oluşmaktadır. Tüm dünya çapında bir hastalık olarak görülen %16-20 değerinde saptanan infertilite kadın ve erkeğe bağlı olarak gelişmektedir. İnfertilite problemlerinin 1/3'ü kadın, 1/3'ü erkek ve 1/3'ü çiftlerin her ikisindeki patolojilerinden kaynaklanır (Ataman, 2007).

İnfertilitenin frekansı ve sebepleri toplumlar arası çeşitlilik gösterir. Çiftlerin %35-45'inde erkek, %45-50'sinde ise kadın kaynaklı infertiliteden oluşmaktadır. Yüzde 15-20 çiftte ise açıklanamayan infertilite kaynaklıdır(Gedik Mutlu, 2012).

Dünya çapında yaklaşık olarak 186 milyondan daha fazla çiftin, ülkemizde ise 1-1,5 milyon çiftin infertilite problemiyle karşılaştığı düşünülmektedir. Ülkemizde Bu bireylerin % 50 sinde, infertilite sebebinin erkek faktöründen kaynaklandığı ayrıca infertilite sorunu, her sekiz çiftten birinde izlenirken, % 60 oranında erkek kaynaklı faktör ya tek başına ya da dolaylı olarak etkilemektedir (Taştan, Erkaya, Abuç, & Ünal, 2020)

2.2. İNFERTİLİTE NEDENLERİ

Ovulatuvar bozukluk, tubal/paritoneal faktör ve erkek faktörleri en sık rastlanan iken, uterin patolojiyle nadir karşılaşılmaktadır ve geri kalanı ise sebebi açıklanamayan infertilite nedenleri olup yaşla birlikte bunların görülme olasılığı değişkenlik gösterir. Genç kadınlarda ovulasyon bozuklukları daha fazlayken, tubal/paritoneal faktör genç ve yaşlılarda eşit orandayken, ovulatuvar bozukluk gençlerde daha fazla görülmektedir. Açıklanamayan infertilite ile erkek faktör yaşlı çiftlerde çok daha fazla karşılaşılmaktadır (Kemik, 2010).

İnfertilite nedeniyle değerlendirilen çiftlerin yapılan değerlendirilmesinde olası patolojiler;

Kadına faktörlü sebepler (%35-45): Ovulatuvar faktör (%35-45), tubal/paritoneal faktör (%25-45), servikal ve immünolojik faktörler (%3-5), diğer (1-2)

Erkeğe ait sebepler (% 45-50)

Açıklanamayan sebepler (% 15-20)

2.2.1. Kadın İnfertilitesi ve Nedenleri

Genel yaklaşım olarak vakalar tedaviye ilk başvurdıklarında propödotik tıp ilkeleri dahilinde hareket ederek öykü, fizik muayene, pelvik muayene ve gerekli laboratuvar

tetkiklerinin dikkatlice ve eksiksiz olarak uygulanması sonucunda ayırıcı tanı yapılmalı ve ona göre tedavi planlanmalıdır (Coşkun, 2015).

Ovulatuvar Faktörler: Kadına bağlı infertilitenin de %30-40'ını oluşturur. Ovulasyon işlev bozuklukları ovulasyonun hiç olmaması (anovulasyon) ya da ayda birden daha az olması (oligoovulasyon) şeklinde tanımlanır. Ovulatuvar bozuklukların tedavisinde başarı oranı genellikle yüksektir.

Ovulatuvar faktörler; Polikistik Over Sendromu (PKOS), Hiperprolaktinemi, Hipotiroidizm, Konjenital Adrenal Hiperplazi, Hipotalamik Hipogonadizm, Prematür Ovaryan Yetmezlik (POY) (Karaca, 2019).

Folikülün gereken gelişimi gösterememesi, gelişen oositi atamaması, ovulasyonun gerçekleşmemesi gibi çoğunlukla patolojik anormallikler olarak karşımıza çıkar.

Ovulasyonun belirlenmesinde kullanılan tekniklerler; menstürel öykü, progesteron konsantrasyonu, bazal vücut ısısı takibi (BVI), LH değerleri, endometriumdan biyopsi ve luteal faz yetmezliği, transvajinal ultrasonografi (TVUSG) (Dinçel, 2019).

Peritoneal ve Tubal Faktörler: Kadın infertilitesinin yaklaşık %25-45'ini meydana getirirler. Tubal faktörlerin belirlenmesinde; Histerosalpingografi (HSG), klamidya antikor testi (KAT), sonohisterografi, kromotubasyon, histeroskopi, ve laparoskopi yöntemleri kullanılabilir (Yalçınkaya, 2019). Kadın infertilitesinde tubal faktörün en sık nedenleri enfeksiyon, operasyon ya da enfeksiyona sekonder olarak gelişen adezyonlardır. Cerrahi işlemlerle tubal faktörlerin tedavisi yapılmaktadır.

Tubal-peritoneal faktörlere neden olan patolojiler; pelvik adhezyonlar, pelvik inflamatuvar hastalık, pelvik operasyonlar, ekstrasjenital orijinli enfeksiyonlar, genital tüberküloz, endometriyozis, tubal nedenler ve polipler, hidrosalpenks (Çolgar, 2006; Dinçel, 2019).

Servikal Faktör: Kadın faktörlü infertilite nedenleri arasında en az rastlanılan çeşididir. Servikal mukus salgısı ejakülatı spermli yakalayarak rezervuar görevi

yaparak spermin canlı kalma süresini uzatır . Konjenital malformasyonlar, servikse travma, cerrahi, serviksin normal mukus üretememesine ve doğurganlığın bozulmasına sebep olabilir. Servikal faktörlerin değerlendirilmesi için genellikle postkoital(PCT) test kullanılabilir. Postkoital test hem servikal mukusun işlevselliğini, hem de servikal mukusa ulaşılabilme yeteneği hakkında bilgi edinmemizi sağlar. (Yalçınkaya, 2019; Karakaş, 2020).

Spermatozoa için reseptif preovulatuvar mukus bol sulu, berrak, ince, asellüler, alkali özellikli ve hücre seyrek bulunur. Ovulasyon döneminde servikal mukusun elastikiyeti artış gösterir ve tespitinde spinbarkeit testi ile değerlendirme yapılır. Mukusun niteliğini açıklayan ve östrojen tesirini gösteren bir diğer test de fern-like testidir (Eroğlu, 2013).

Ayrıca servikal faktör değerlendirilmesinde; gerek duyulan olgularda Sims-Huhner testi ve anti sperm antikorların araştırılması kullanılmaktadır. (Çolgar, 2006).

Uterin Faktör: Konjenital uterin malformasyonları, intrauterin uterin yapışıklıklar, uterin myomlar-leiomyomlar, kronik endometrit ve endometrial polipler kadın uterin faktör patolojilerini oluşturmaktadır. Uterin faktörlerinin beirlenmesinde; Histeroskopi, HSG, TVUSG ile sonohisterografi (SIS) kullanılan tekniklerdir. Her birinin avantajları ve dezavantajları olduğundan seçim her hastanın gereksinimine göre bireysel olarak yapılmalıdır (Dinçel, 2019; Karakaş, 2020).

İmmünolojik Faktörler: İmmünolojik faktörler infertilite nedenleri arasında yaklaşık %5-3'lük bir yere sahiptir. İmmün faktörler etkileri zamanla daha da önem kazanmaktadır. Antifosfolipid antikorlar, antinükleer antikorlar, antitiroid ve antisperm antikorları açıklanamayan infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıpları olan vakalarda çoğunlukla üzerinde çalışılan antikorlardır. Prematür ovaryan yetmezlik ve açıklanamayan infertilitede anti over antikorları (AOA) sebep gösterilmiş, IVF sikluslarına başarısız işlemlerde otoimmün bozukluklar sebep olarak gösterilmiştir. AOA'ları olan bazı vakalarda aynı zamanda Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)'a karşı antikorlar gösterilmiş olsa bile kadın infertilitesindeki rolü hakkında tam olarak

bilinmemektedir. Antisperm antikorları (ASA) infertil kadın ve erkeklerde %9-12,8 oranında saptanmış olmasına karşın bu oran fertil kadınlarda %1,4 ile fertil erkeklerde %2.5 olarak bulunmuştur. İmmün testlerin seçimi, sonuçlarının değerlendirilmesi ve tedavi yönetimindeki farklılıklardan dolayı immünolojik faktör çalışmaları devam etmektedir (İlgın, 2008).

Genel olarak immünolojik infertilitede rol oynadığı düşünülen durumlar;

- Bozulmuş spermiyogram
- Geçirilmiş skrotal travma ve operasyonlar
- Negatif postkoital testler
- Sperm penetrasyon testlerinde bozukluk
- Nedeni açıklanamayan infertilite
- Habitüel abortus (Coşkun, 2015).

Genetik nedenler: X kromozomuna bağlı delesyon ve translokasyon, turner sendromu, döllenme ve fekonadabilite ile ilgili DNA dizisindeki genlerdeki FSH, Lüteinleştirici Hormon (LH) reseptör mutasyonu, enzim eksiklikleri infertilitenin genetik faktörleri olarak sayılmaktadır (Güleç Ceylan, 2007).

2.2.2. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri

Tüm faktörlerin yaklaşık %40-50 gibi yüksek bir oranını infertil çiftler arasında erkek faktörü oluşturmaktadır. İnfertil erkeğin değerlendirilmesi sistemik şekilde kadın partnerle birlikte araştırılmalıdır. Anatomik olarak üç grupta erkek infertilitesi incelenir. (Yalçınkaya, 2019).

Hipotalamik-Hipofizer Hastalıklar: Gonadotropik Hormonlar (GnRH) veya gonadotropin yetersizliğine sebep olan tüm hipotalamik-hipofizer hastalıklar yol açabilir. Fertiliteyi, hormon yetmezliği ya da hormonların aşırı miktarda salgılanması etkilemektedir ve sonuçta ROS hasarının süresi ve ortamı oluşmaktadır.

Erkek infertilitesine neden olan hipotalamo-hipofizer hastalıklar; konjenital hastalıklar (konj. GnRH eksikliği, hemokromatozis, multi-organ genetik rahatsızlıklar), edinsel nedenler (hipofiz ve hipotalamus tümörleri, infiltratif hastalıklar, travma, ameliyat ve radyoterapi, vasküler nedenler, hormonal, ilaçlar), sistemik hastalıklar (kronik hastalıklar, nütrisyonel hastalıklar, obezite) olarak üç gruba ayrılır (Er, 2009).

Testiküler Hastalıklar: Primer gonadal yetmezlik, azoospermi ve oligozoosperminin önemli sebeplerindendir. İnfertiliteye neden olan testiküler hastalıklar; Konjenital Hastalıklar (Klinefelter Sendromu –XXY, Kriptorşidizm, Myotonik distrofi, Konjenital anorşi, Varikosel, Androjen insensitivite sendromu, 5α Redüktaz eksikliği, Tek gen mutasyonları ve polimorfizmleri, Y kromozom delesyonları), Edinsel nedenler (viral orşit, granülamatöz orşit, epididimo-orşit, ilaçlar, iyonize radyasyon, çevresel toksinler, hipertermi, immünolojik hastalıklar, travma, torsiyon, sistemik rahatsızlıklar (Koç, 2013).

Sperm Transport Problemleri: Epididimis, sperm maturasyonu ve transportunda önemli yeri vardır. Duktus deferens olgun spermelerin epididimisten üretraya aktarılmasını sağlar. Post-testiküler sebepler arasında epididim ve duktus deferensteki sorunlar infertiliteye sebep olurlar. Epididim yokluğu, disfonksiyonu veya obstrüksiyonu testiküler sperm üretimi normal olmasına rağmen infertiliteye neden olur. İntrauterin östrojen sorunları da epididimal disfonksiyona neden olabilir. Erkek infertilitesi duktus deferensin konjenital veya edinsel anormalilerinden ortaya çıkabilir. Duktus deferensin bilateral obstrüksiyonu, ligasyonu, peristaltizmde değişiklik infertiliteye yol açabilir. Obstrüksiyon gonore, klamidy, tüberküloz gibi enfeksiyonlarından kaynaklı gelişebilir. İnfertil erkeklerin %1-2'sinde vas deferensin konjenital olmadığı görülür. Çoğunda kistik fibrozis transmembran regülatör gen (CFTR) mutasyonu vardır. Genetik bir hastalık çeşidi olup, primer siliyer diskinezi siliya fonksiyonunu ve yapısını bozar. Klinik olarak tekrarlayan sinopulmoner

enfeksiyonlar, bronşiektazi, situs inversus ve astenozoospermi veya oligozospermi ile birlikte erkek infertilitesi görülür (Boyraz, 2013).

- Epididimal tıkanıklık veya fonksiyon bozukluğu
- Doğuştan vaz deferens yokluğu (CFTR gen mutasyonları)
- Enfeksiyonlara bağlı vaz deferens tıkanıklığı (klamidya, tüberküloz)
- Vazektomi
- Kartagener sendromu (primer siliyer diskinezi)
- Young sendromu
- Ejakülatuvar (spinal kord hastalıkları, otonomik disfonksiyon) (Yıldız, 2019).

Açıklanamayan İnfertilite: Geleneksel tetkiklerle nedeni belirlenemeyen ve toplam infertil çiftlerin yaklaşık %15-20'sinde rastlanılan faktördür. Bu gruptaki hastaların tedavisi yapılırken sebebi bilinmediğinden dolayı fertilite oranını artıracak teknikler seçilecektir. Bu grup infertilitede sebep kesin olarak bilinmemekte fakat bazı ihtimaller öne sürülmektedir. Follikül gelişimindeki farklılıklar, ovulasyon, luteal faz bozuklukları, sperm konsantrasyonları yanında motilite ve normalin altındaki sayı aralığı gibi sebepler bazı açıklanamayan infertil çiftlerde rapor edilebilmektedir. Açıklanamayan infertilite hastalarında çoğunlukla; ekspekten tedavi, klomifen sitrat, gonatropin ile overyan hiperstimulasyon, IUI ve IVF gibi YÜT uygulanmaktadır (Kara, 2011; Yalçinkaya, 2019).

Açıklanamayan infertilitede görülebilecek etyolojik sebepler; antagonist servikal sekresyonlar, erken embriyonal implantasyonda defektif endometrial reseptivite, anormal tubal siliyal aktivite, defektif ovum pick-up mekanizması, luteinize unrüptüre follikül sendromu, ek hormon anormallikleri, bozulmuş oosit ve/veya sperm fertilizasyon kapasitesi, minimal veya orta düzeyde endometriozis, immünolojik faktörler, bozulmuş peritoneal makrofaj aktivitesi, bozulmuş peritoneal sıvı antioksidan fonksiyonu, implantasyon başarısızlıkları (Eroğlu, 2013; Kandemir Deniz, 2013).

2.3. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi; spermin oluşumundan ve devamının sağlanmasından, geçici depolanmasından, beslenmesinden, spermi dışı üreme sistemine aktarılmasından, erkeklik androjen hormonlarının sentezinden ve sekresyonundan sorumludur. Erkek üreme sistemi iç genital ile dış genital organları dört bölümden oluşur.

- Gonadlar (testisler):Spermin ve androjenlerin oluşumunu sağlar.
- Genital boşaltım kanalları (epididim, duktus deferens, ejakülatuar kanal ve üretra): Spermi dışarıya taşıyan boşaltım yollarıdır.
- Aksesuar cinsiyet bezleri (vezikula seminalisler, prostat ve bulboüretral bezler): Salgılarla semen kitlesini üretirler.
- Penis : Erektile dokudan oluşan çitleşme organıdır(Dinçel, 2019) .

2.3.1. Gonadlar (Testisler)

2.3.1.1. Testis: Testisin ekzokrin ve endokrin salgılama özelliği olan bileşik tübüler yapıda bir çift oval şekilli üreme organıdır. Ekzokrin ürünü canlı sperm hücreleri; endokrin ürünü ise leyding hücrelerinin salgıladığı testesteron'dur. Testisler skrotum denilen penisin arkasından uzanan deri kaplı, yüksek pigmentli, kaslı bir yapının içine yerleşmişlerdir. İki adet olan testisler doğumdan hemen önce yaklaşık fetüsün gelişim periyodunun 7. ayında karın boşluğunun dışında skrotumun içine inerek testisin inişi şeklinde tanımlanır. Bu konum vücut sıcaklığının 2-3 derece altındadır. Bu düşük sıcaklık spermatogenez için 33-34°C ısıyı gerekli kılmıştır. Oldukça kalın sıkı bağ dokusu yapısındaki tunica albuginea, sağ ve sol taraflara yerleşerek, skrotumun iç yüzeyini döşer. Sağ testis yaklaşık %10 daha ağır olup sol testise göre, her ikisi de 10-15 gr ağırlığında, yaklaşık olarak 4-5 cm x 2,5 cm x 3 cm büyüklüğe sahiptirler. Sperm sayısı ile hormonlarda FSH, LH, prolaktin hormonu (PRL) ve

testis hacmiyle arasında doğrudan uyum bulunur. Testesteronun yaklaşık %95'i testislerde; geri kalan %5'i ise adrenal korteksten salgılanır (Osaloğlu, 2013) .

2.3.1.2. Seminifer tübülleri: Her bir testiste yaklaşık lobül yüksek düzeyde kıvrımlı birkaç seminifer tülden meydana gelir. Testisin bu her bir lobülü, içinde sperm üretilen Testisin salgılayıcı dokusu olup aktif holokrin tipde spermium şeklinde salgılama yapar. Her bir testiste yaklaşık 250-300 lobül olup her bir lobül içerisinde yüksek düzeyde kıvrımlı olarak 1-4 adet seminiferöz tübül olmak üzere tüm testiste yaklaşık 1000 kadar seminifer tübülleri mevcuttur. Bu tübülleri içerisinde spermatozoalar üretilmektedir. Seminifer tübülleri düz tübül bölümü mediastinumun içinde anastomozlaşan kanallar sistemi ile rete testise bağlanır ve içerdiği spermleri rete testis kanallarına boşaltılır. Her bir seminifer tübül yaklaşık 30-50 cm uzunluğunda ve tübülleri çapı yaklaşık 150-250 µm arasındadır. Tübülleri kan damarları, lenfositler, plazma hücreleri ve interstisyel hücre (leydig hücresi) kümeleri içeren bağ dokusu ile birbirinden ayrılır. İnterstisyel hücreler hipofiz bezinin kontrolünde puberte ile birlikte androjenleri salgılayan endokrin hücrelerdir (Çetinkaya, 2013; Ross & Pawlina, 2017).

Seminifer epitelyum iki temel hücre popülasyonundan oluşan kompleks, çok katlı, sıra dışı epitel hücreler; sertoli hücreleri, spermatogenik hücreler, leyding hücreleri olmak üzere 3 çeşit hücreyi içerir.

2.3.1.3. Sertoli hücreleri: Destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da adlandırılan bu hücreler puberteden sonra çoğalmazlar. Komşu spermatogenik hücreleri çevreleyen ve onların aralarındaki boşlukları kaplayan yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip polimorfik, bol sitoplazması olan, nükleusları soluk görünen piramidal hücrelerdir. Ayrıca seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca uzanarak tübülleri yapısal düzen verirler. Spermleri otoimmün hücrelerinden koruyarak besler. Hatta sperm üretimini teşvik eden ve germ hücrelerinin canlılığını kontrol edebilen sinyal molekülleri salgılar (Ross & Pawlina, 2017).

Sertoli hücreleri FSH ve testosteron reseptörleri taşırlar. Ayrıca büyüme faktörleri ve Müller kanalı inhibe edici faktör (MIF) gibi parakrin faktörleri de salgırlar. Seminiferöz tübüller daha sonra birbirleriyle ağzlaşmalar yaparak rete testisi oluşturarak spermatozoonlar buradan çıkan 10-20 adet eferent kanallar ile epididime iletilir (Aslan, 2019; Işık, 2019).

2.3.1.4. Spermatogenik hücreler: Düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, testisin erken gelişim evresinde gonadol yol kesesinden kaynaklanan ve gonadol kabartılarda kolonize olan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Spermatogeneik hücreler komşu sertoli hücrelerinin arasında ilerleyici gelişim sergileyen belirgin olmayan tabakalar halinde düzenlenmişlerdir. Spermatogonyum olarak adlandırılan en immatür spermatogenik hücreler bazal laminanın üzerinde uzanırlar. Spermatid olarak adlandırılan en matür hücreler sertoli hücrelerinin apikal bölümüne tutunmuşlardır ve tübülün lümeninin sınırını oluştururlar (Kaya, 2019).

2.3.1.5. Leydig hücreleri (interstisyel hücreler): Geniş, poligonal, eosinofilik hücreler olup pubertede gelişen, tipik olarak lipid damlacıkları içerirler. Eozinifilik özelliğinden dolayı bol miktarda granülsüz endoplazmik retikuluma (aER) sahiptirler. Kolesterol, testosteron yapımı için gerekli enzimler aER ile ilişkilidir. Tübüloveziküler kristali mitokondriyonlar, steroid-salgılayan hücrelerin diğeri bir karakteristik özelliğidir ve leyding hücrelerinde mevcuttur. Leyding hücreleri erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak testosteron salgırlar. Testosteronun salgılanması embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için salgılanmalıdır. Leyding hücreleri erkek fetüsün erken farklılaşmasında aktiftir ve daha sonra fetal hayatın yaklaşık 5.ayından başlayarak inaktif oldukları periyoda girerler ve fibroblastlardan fark etmek zordur. Pubertede gonadotropik stimülasyona maruz kaldıklarında yeniden androjen salgılayan hücreler olurlar ve ömür boyu aktif kalırlar (Ross & Pawlina, 2017).

Leydig hücreleri ortalama hergün 7 mg testosteron hormonu üretilip kan ve lenf kapillerine boşaltılmasını sağlayarak endokrin sekresyon yaparlar. Üretilen bu

testesteron kapillerleri geçerek seminifer tübüllerine ulaşarak spermatogenezi uyarır. Erkek embriyolarında, Leydig hücreleri tarafından testesteron yedinci gelişme haftasında salgılanır ve ikinci trimesterde en yüksek seviyeye ulaşılır. Bu sayede erkek cinsel organlarının anatomik farklılaşması ile sonuçlanır. Çocuklukta testesteron konsantrasyonları düşük olup ergenlik döneminde artarak, karakteristik fiziksel değişiklikleri harekete geçirir ve spermatogenezi başlatır. (Sarıkaya, 2019).

2.3.2. Genital Kanal Sistemi

Boşaltım kanal sistemi mezonefrik kanaldan ve mezonefrik tübüllerden gelişir. Leydig hücrelerinin ilk gelişimi ve testesteron salgılanmasının başlaması mezonefrik kanalın gelişmekte olan testis için boşaltım kanal sistemine farklılaşmasını stimüle eder. Gelişmekte olan testise bitişik mezonefrik kanal parçası kıvrımlı hal alır ve duktus epididimise farklılaşır. Bu bölgede kalan mezonefrik kanallardan birkaçı gelişmekte olan seminifer kordonlar ile temas ederek sonunda duktuli efferentese gelişirler. Bunlarda gelişmekte olan rete testisi duktus epididimise bağlar. Mezonefrik kanalın distal parçası kalın bir düz kas örtüsü edinir ve duktus deferens haline gelir. Distal mezonefrik kanalın ucu ejakülatuar kanalı ve veziküla seminalisi oluşturur. Seminifer tübüllerden aktarılan spermatozoa ve sıvıları testisten başlayıp penisten dışarıya atılacak sırasıyla; duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakülatuar kanal ve üretrayla bırakılır (İbiş, 2020; Ross & Pawlina, 2017).

2.3.2.1. Epididim: Spermiumlar için olgunlaşma ve depolama yeri olan kanal sisteminden oluşur. Testislerin üst arka yüzeyin de uzanan yaklaşık 7,5 cm uzunluğunda duktuli efferentes ve duktus epididimisi içinde barındıran ay şeklindeki kanaldır. Yaklaşık 7,5 cm uzunluğundadır ve duktuli efferentesten, duktus epididimisden ve ilişkili düz kaslardan, damarlardan ve bağ dokusu örtülerinden oluşmaktadır. Duktus epididimis yüksek düzeyde kıvrımlı 4-6 m uzunluğunda bir tüptür. Epididimis baş(caput), boyun ve kuyruk(cauda) bölümlerine ayrılmaktadır. Duktuli efferentes baş kısmını, duktus epididimis ise gövde ve kuyruk kısımlarını işgal etmektedir. Testisten epididimise giren yeni üretilmiş spermiler, duktus

epididimise gelip burada 1-14 gün boyunca kalır ve buradaki kanallardan ilerledikçe hareket ve oositi dölleme yeteneği kazanıp kuyruk kısmında depolanırlar. Bu olgunlaşma sürecinde hormon olarak androjene ihtiyaç duyar (Kaya, 2019).

2.3.2.2. Duktus deferens(Vas deferens): Boşaltım kanalı sisteminin en uzun parçasıdır. Epididimisin kuyruk bölgesinden yumuşak bir kas kasılmasıyla spermiumların sadece ejakulatorius kanalına iletilir. Vas deferens, skrotumun içinde bağ dokusu, kan damarları ve sinirleri spermatik kord denilen yapıya birleştiren kalın kaslı bir tüptür. Oradan inguinal kanaldan geçerek abdomene uzanır. Ampula bölümü hariç kaslı yapıda olup ejakulatorius yapımından önce ampula kısmında spermiumlar için depolama yeridir. Ampulla sonunda seminal vezikül kanallarıyla birlikte prostata girer ve oradan da üretraya açılır(Aras, 2009).

2.3.2.3. Ejakulator kanallar: Vaz deferens ve seminal vezikül ile prostat bezi içeriğinin karıştırılıp ejakulat (semen, meni) olarak üretradan çıkışını sağlayan kanaldır (Özkara G. , 2013).

2.3.3. Aksesuar Genital Bezler

Testosteron hormonu kontrolündeki bu bezlerin genel olarak görevi spermilerin beslenmesi, hareketinin artırılması, semenin likefaksiyonu ve vajinanın asidik ortamının nötralizasyonunun sağlamasıdır. Bu bezlerin hipofonksiyonu veya enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan seminal lökositler nedeniyle semen vizkozitesi artar bu da sperm konsantrasyon ve hareketliliğinin azalmasına yol açar. Erkeklerin %12-30'unda görülen bu durum fertilitiyi olumsuz yönde etkiler (Özkara G. , 2013).

2.3.3.1. Seminal veziküller: Mesanenin posteriyor duvarının üzerinde, duktus deferensin ampulasına paralel konumlanmış bir çift, uzun ve yüksek düzeyde katlanmış tübüler bezlerdir. Her bir vezikula seminalisin kısa boşaltım kanalı duktus deferensin ampulasıyla birleşerek ejakulatorius kanalı oluşturur. Seminal vezikül, ejakulatin yaklaşık %60-70'ini oluşturan bol fruktoz ve diğer besleyici maddelerce (basit şekerler, amino asitler, askorbik asit ve prostaglandin) zengin hafif alkalik

vizk z bir sıvı salgılar. Seminal vezikül sıvısı sperm mitokondrisinin di i üreme sisteminde hareketini ve bunun için ATP üretimine katkı sa lar. Salgının bir diğer işlevi de kadın üreme sistemindeki immün aktiviteyi baskılamaktır. Salgıladı ı koagülan semenogelin proteini prostat bezinden salgılanan prostat spesifik antijen (PSA) ile degradasyona uğrayarak spermilerin kapasitasyon esnasında ileri hareket kazanmasını sa lar (Aslan, 2019).

2.3.3.2. Prostat bezi: Cinsiyet salgı bezinin en b y  d r. Ejakulatın %20-30'unu oluşturan morfolojik ve işlevsel bakımdan birkaç zona ayrılmaktadır. Seminal sıvının oluşumunda görevli olup, şeffaf, hafif alkali (pH 7,29) sıvı salgılar. Bu sayede vajinadaki asit ortamın nötralizasyonunu sağlanmış olur. Semen geçici olarak kalınla masına ve di i üreme sistemi içerisinde devamlılığının sürmesini sa lar. Bez pelvis içerisinde, mesanenin tabanında ve üretranın prostatik parçasını çevreleyerek, 30-50 kadar t b lo-alveolar bezden meydana gelir. Prostat bezi hem glandüler hem de kas dokularından oluşur. Fibromusküler stroma, prostat bezinin üretranın anteriorunda kalan anterior yüzeyini işgal etmektedir ve yüksek miktarda düz kas lifi içeren düzensiz sıkı ba  dokusundan oluşmaktadır. Bez prostatik asit fosfotaz (PAP), fibrinolizin, sitrik asit ve prostat-spesifik antijen (PSA) salgılar (Ko o lu, 2020).

2.3.3.3. Bulbo- retral bezler (Cowper bezleri): Bir  ift halinde, 1 cm çapında, ürogenital diyaframda yer alır. Bezlerden her birinin kanalı ürogenital diyaframın inferior fasiyasının ortasından ilerleyerek penil üretranın başlangıç parçasıyla birleşir. Cowper bezleri preseminal sıvıyı salgırlar. Albumin açısından zengin, alkali, mukoid, berrak, mukus benzeri salgısı yüksek miktarda galaktoz, galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metil pentoz içermektedir. Seksüel stim lasyon, preseminal sıvıyı oluşturan ve penil üretranın kayganla tırılmasında hizmet eden bu salgının salgılanmasını sa lar. Bu sayede ejakulata has koku oluşturularak kayganlık ve akıcılık vererek spermilerin üretranın idrar atıklarından temizlenmesine yardımcı olur ( zkara G. , 2013; Ross & Pawlina, 2017).

2.3.4. Penis ve Üretra

Penisin ereksiyonu korpus kavernozumlardaki ve korpus spongiozumdaki vasküler boşlukların dolması ile gerçekleşmektedir. Penis, başlıca iki dorsal erektile doku kütlesi olan korpus kavernozumlardan ve bir ventral erektile doku kütlesi olan korpus spongiozumdan oluşmaktadır. Penis, somatik, sempatik ve parasempatik sinirler tarafından innerve edilmektedir. Penis dokusu boyunca çok sayıda duyusal sinir sonlanması dağılım göstermektedir. İdrarın ve semenin vücut dışına atılımına ve spermin dişi üreme sistemine aktarılmasını sağlayan dış kısmı deri ile kaplanmış organdır (Aslan, 2019).

2.4. SPERMATOGENEZ

Spermatogenez, testislerin kök hücresi olarak adlandırılan spermatogoniumların farklılaşarak sperm hücresi oluşuncaya kadar geçen evredir. Germ hücreleri kökenlerini endodermden alır ve sperm hücresinin seminifer tübüllerde puberte ile başlayıp hipofiz bezinden salgılanan GnRH artmasıyla yaklaşık 74 gün sürer. Hormonal iletişim ve etkileşim puberteden hemen önce başlayıp ve yaşam boyu sürmektedir. Üç faza ayrılır (Çetinkaya, 2013). Bunlar:

2.4.1. Spermatogonial Faz

Bu evrede puberte dönemiyle birlikte spermatogonial kök hücreleri mitozla bölünerek çoğalırlar. Tip A koyu spermatogonyum, tip A açık spermatogonyum ve tip B koyu spermatogonyum olmak üzere üç tip spermatogonyum bulunur. Koyu tip A spermatogoniumlar kök hücreleri olup bölünerek açık tip A spermatogoniumlara farklılaşırlar. Açık tip A spermatogoniumlar da mitoz bölünme ile tip B spermatogoniumlara dönüşürler (Sarıkaya, 2019; Taşkurt Hekim, 2019).

2.4.2. Spermatosit Fazı

Tip B spermatogoniumlar progenitor hücreler olup primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler oluşur oluşmaz mayoz bölünmenin profaz aşamasına geçerek yaklaşık 21-22 gün sürer. Bu süreçte germ hücreleri diploit (2n)

46 (44XY) kromozom içerirler. Daha sonra mayoz bölünme geçirerek haploit (n) 23 (22Y yada 22X) kromozomlu yapıya dönüşerek DNA miktarlarını eksiltirler. İlk mayoz bölünme sonrası sekonder spermatosit hücreleri oluşur. Sekonder spermatositler mayoz-II bölünmenin neticesinde 4 adet DNA'sı yarılanmış 23 kromozomlu haploid spermatidleri oluşturur. Sperm hücrelerinin farklılaşma süreçleri boyunca Sertoli hücrelerinin etrafında bulunan girintilere gömülü olarak konumlanırlar çünkü sertoli hücreleri sperm hücrelerini destekleyerek onları korur ve besin ihtiyaçlarını karşılar (Doğan, 2008).

2.4.3. Spermatid Fazı (Spermiogenesis)

Bu fazda hücre bölünmesi olmaz. Spermatidler gelişip farklılaşarak 4 aşamada olgun bir sperm hücresine dönüşür. Bunlar:

Golgi Aşaması: Bu faz spermatidin çok sayıdaki golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif granüllerin ulunması ile karakterizedir. Bu proakzomal granüller, glikoprotein bakımından zengindirler ve akrozomal vezikül olarak isimlendirilen ve nükleer zarfa komşu, membranla sınırlandırılmış bir vezikülü oluşturmak için bir araya toplanırlar. Bu fazda vezikül içeriğini artırarak genişler. Akrozomal vezikülün konumu gelişen spermin ön kutbunda belirirler. Sentriyollerde spermatidin arka kutbuna göç ederek orada olgun sentriyol plazma membranına dik açıyla konumlanır. Sentriyol, Sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübülün bir araya gelmesini sağlar (Aras, 2009).

Kap Aşaması: Akrozomal vezikül nükleusun ön parçasının yarısına yayılarak yeniden şekillenmiş yapıya akrozomal kep adı verilir. Nükleer zarfın, akrozomal kapağın tabanındaki kısmı porlarını kaybederek kalınlaşır. Nükleer içerik de yoğunlaşarak ardından sentriyol gelişerek flagellumu oluşturur (Daylan, 2021).

Akrozom aşaması: Bu fazda spermatid kendini yeniden hizalar ve baş sertoli hücresinin içerisine gömülerek bazal laminaya doğru yönelir. Seminifer tübülün lümenine doğru gelişen flagellum uzanır. Spermatidin kondanse olan nükleusu

yassılaşıarak uzar. Akrozom vezikülü ile granülü ayrılarak plazma membranının ön kısmına taşınır ve stoplazma posteriyora doğru kayar. Olgun bir spermde akrozomal kep üçte ikilik bölümünün anterior kısmını sarar ve içerisinde hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfotaz ve akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteazları bulundurur. Akrozomal enzimler lizozom gibi görev üstlenerek korono radyata hücrelerini ayıklar ve zona pellucidayı sindirirler. Çift sentriyolden bir tanesi flagellumu yani spermin kamçısını oluşturur. Mitokondriler flagellumun proximal bölümünde toplanıp hareketi için enerji sağlarlar ve böylece spermin orta parçasını oluştururlar (Çetinkaya, 2013; Acar, 2020).

Olgunlaşma (maturasyon) fazı: Spermatit hücresinin tüm organelleri tamamlanır ve geriye kalan artıklar sertoli hücreleri tarafından fagositozla yok edilerek edilerek olgun spermatozoa'ya dönüşürler. Ardından sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tubül lumenine aktarılırlar. Epididimde olgunlaşarak işlevsel olarak hareket ve dölleme kabiliyeti kazanırlar. Buradan da ejakülasyon yolu ile vaz deferens yardımıyla üretra bölününe oradanda dışarıya atılırlar. Spermatogonyum hücresinin olgun sperm haline ulaşması için yaklaşık olarak 64-65 gün sürer (Kılıç, 2021).

2.5. SPERMİN YAPISI

Spermiogenesis sonucunda sperm oluşur. Matür sperm yaklaşık olarak 60 µm boyundadır. Sperm başı yassılaşmış olup haploid nükleusları bulunduran 4,5 µm boyunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır. Fertilizasyon için akrozomdaki enzimler zona pellucidayı delmeyi sağlar. Kuyruk yaklaşık 45– 50 µm uzunlukta olup hareketi sağlar. Normal şartlar da bir sperm hücresi dakikada 3 mm hızla yol alabilmekte ayrıca kuyruğun korunmasını sağlayan plazma zarı bulunmaktadır. Sperm kuyruğu; boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılır. Flagellumun aksonem denilen ortada bir çift, periferinde dokuz çift mikrotübül sayesinde sperm hareket yeteneği kazanır. Orta kısım hareket için enerji sağlayan mitokondri bakımından zengindir (Aslan, 2019).

2.6. İNFERTİL ÇİFTLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertiliteye sebep olan faktörleri ortaya çıkarmak için infertil çiftler birlikte değerlendirilmeye alınırlar. Eşlerin infertiliteye katkıda bulunan birden fazla faktöre sahip olabileceğini göz önünde bulundurarak, infertilitenin en yaygın nedenlerini saptamak için tam bir başlangıç tanısı değerlendirme yapılmalıdır.

- İnfertil çiftlerden ayrı ayrı detaylı anamnez alınmalıdır.
- Basitten karmaşıklığa doğru değerlendirmeler yapılır.
- Çiftlerin maddi durumu hakkında bilgi alınmalıdır (Durgun Ozan, 2013).

2.6.1 Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Kadın partnerden detaylı bir anamnez alınmalıdır. Genel tıbbi öykü, Vücut Kitle İndeksi (VKI) üzerine ve gonadal fonksiyonları etkileyen tiroid hastalıkları, galaktore, hirsutizm gibi endokrin hastalıklar tespit edilmelidir. Meslek, toksin maruziyeti ve ilaç kullanımı sorgulanmalıdır. Jinekolojik öyküde, adet düzeni, önceki gebeliklerin prognozu, cinsel yolla bulaşan hastalıklar (CYBH) öyküsü, kullanılan kontrasepsiyon metodları, önceki fertilitate tedavileri sorgulanmalıdır. Geçirilmiş pelvik cerrahiler, adezyona neden olarak tuba-ovaryan fonksiyonu etkileyebileceğinden önem taşır. Kronik pelvik ağrı, dismenore ve disparoni endometriozis bulguları olabilmesi açısından önem taşır. Servikal sitoloji değerlendirilmelidir (Durgun Ozan, 2013).

Fiziki Muayene: VKI, tiroid muayenesi, meme başı akıntısı, hirsutizm ve diğer hiperandrojenizm bulgularının aranması genel muayene özellikleridir. Jinekolojik muayenede; servikojenital anormallikler, uterin boyut, pozisyon, mobilite, cul-de-sac ya da adneksiyal kitle açısından değerlendirme yapılmalıdır. Pelvik ultrasonografi pelvik değerlendirmenin tamamlayıcısı olarak kabul edilmektedir.

Değerlendirme testleri; ovulatuvar fonksiyonu, ovaryan rezervi, uterin kavite ve tubal patensi ortaya koymak amacıyla planlanır.

Ovulatuvar fonksiyonun değerlendirilmesiyle; düzenli adet döngüsü ve ovulasyonu ortaya çıkarır.

Endometriyal biyopsi; ovulasyonun predikte edilmesini sağlar.

Mid-luteal Progesteron (MLP); ovulasyonun konfirme edilmesinde kullanılır.

Seri Ultrasonografik Değerlendirme; foliküler gelişme, corpus luteum ve luteal endometriyum tespitinde kullanılır.

Hormonal Değerlendirme; over-rezerv testleri, prolaktin ve tiroit işlevi değerlendirilir.

Overyan Rezerv; fertilité şansının ve kontrollü overyan stimölasyona tepki değerlendirilir.

Anti-Müllerian Hormon; ovaryan rezerv değerlendirilir.

Serviksin Değerlendirilmesi; ovulasyon döneminde servikal mukusta sperm motilitesi değerlendirilir.

Uterusun Değerlendirilmesi; polipler, myomlar, adezyonlar, uterin septum, fertilité ve YÜT ile elde edilen gebeliklerin prognozunu değerlendirir.

Transvajinal ultrasonografidir; uterin kavitesi değerlendirilir.

HSG; tubal patensi ve uterin kaviteyi değerlendirir.

Sonohisterografi; polip,miyom, yapışıklık gibi rahim içi problemler değerlendirilir.

Histeroskopi; uterin kavite değerlendirilir.

Laparoskopi-Histeroskopi; uterin konjenital anormaliler değerlendirilir.

Histerosalpingografi (HSG); tüplerin radyolojik değerlendirilmesidir.

Proksimal tubal oklüzyon; tubal spazm, mukus plağı ya da debrisé bağı değerlendirilmez.

Chlamydia trachomatis serolojik taraması; tubal hasar riski olan vakalarda HSG ile birlikte değerlendirilir.

Hysterosalpingo-kontrast sonografi (HyCoSy); kontrast maddenin tubal akışının değerlendirilmesidir.

Laparoskopik kromopertubasyon; tubal patensin değerlendirilmesidir (Uzunlar, 2019).

2.6.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkek partnerden öncelikle detaylı bir tıbbi anamnez alınmalıdır. Öyküde sorulması gereken sorular; yaş, koit sıklığı ve zamanlama geçmişı, infertilite süresi, önceki

fertilite durumları (sekonder male faktör), çocukluk çağı rahatsızlıkları ve pubertal gelişimin değerlendirilmesi, sistemik medikal rahatsızlıklar (diabetes mellitus, üst solunum yolu hastalıkları), geçirilmiş operasyonlar, kullanılan ilaçlar ve alerji, cinsel öykü (cinsel yolla bulaşan hastalıklar), gonadotoksik ajan maruziyeti (çevresel, kimyasal ve ısı) gibi durumların varlığı tespit edilmelidir (Uzunlar, 2019).

Devamında detaylı fizik muayene, semen analizi ve hormon (FSH, LH, TSH, PRL, Testosteron) parametrelerine bakılmalıdır. Eğer gerek görülürse sonrasında endokrinolojik, ultrasonografik, genetik incelemeler yapılabilir (Çiçek & Mollamahmutoğlu, 2009; Dinçel, 2019).

Fiziki muayene: Normal androjenizasyonu belirten sekonder seks karakterleri, saç dağılımı, jinekomasti, iskelet sistemi gelişimi gibi genel bilgiler ve genital sistem detaylı değerlendirilir. Penil uretral meatusun lokalizasyonu ve testisin palpasyonu ile inmemiş testis, boyut, kitle bakımından araştırılmalıdır. Prader orşidometresi testis volümünü değerlendirilmesini sağlar. Normal değerler 12-30 ml aralığındadır. Hipogonadizm, testiküler disfonksiyon azalmış volümle ilişkilidir. Epididimis ve bilateral vas deferans varlığı değerlendirilmelidir. Epididimide kist ya da nodularite saptanması, konjenital veya enflamatuar obstrüksiyonu olduğu düşünülür. Spermatik kordun muayenesi varikoseli değerlendirmeye yardımcıdır (Uzunlar, 2019).

Erkeğe Yönelik Testler

Semen Analizi

Erkek infertilitesinde en çok kullanılan seminifer tübüllerin, epididimlerin ve aksesuar seks bezlerinin durumu hakkında bilgi veren önemli bir tanı yöntemidir. Spermin özellikleri (motilite, konsantrasyon ve morfoloji) ve seminal sıvının analizinde değerlendirilen parametreleri içeren tanı testidir. Semen örneklerinin aynı standartta değerlendirilmesi için en az 2-3 günlük, en fazla 5 günlük cinsel perhiz yapılması önerilir. Perhiz süreleri kısaldığında semen volüm ve yoğunluğunda azalma olurken sperm motilite ve morfolojileri değişkenlik göstermez. Perhiz süreleri uzadığında ise semen volümünde ve yoğunluğunda artmayla birlikte ölü, hareketsiz ve morfolojisi bozuk spermelerde miktar artar. Örnek evde toplanmışsa bir

saat içinde vücut sıcaklığı korunarak laboratuara ulaştırılmalıdır. Bir bireyin semen örneklerinde sperm sayı ve konsantrasyonu değişkenlik gösterebileceğinden bir ay aralıkla iki semen örneğine bakılır (Kaya, 2019).

Tablo 1. WHO'nün yapmış olduğu son düzenlemeye göre semen parametreleri analiz referans değerleri ;

Görünüm	Homojen, gri-opak
Volüm	>2.0 ml
Çözülme	60 dakika içinde
Ph	>7.2-8.0
Viskosite	<3
Sperm konsantrasyonu	>15 milyon/ml
Toplam sperm sayısı	>39 milyon/ejekulat
Motilite yüzdesi	>%40
(Ejekulasyondan sonra 60dk içinde) Canlılık	a (ileri hızlı) b (ileri yavaş) c (yerinde hareketli) d (hareketsiz)
Lökosit	>%75
Normal morfoloji	>%4
Çinko (mmol/ ejakulat)	>2.4
Fruktoz (mmol/ ejakulat)	>13
Alfa- glukozidaz (nötral) (mU/ ejakulat)	>20

WHÖ'ne göre referans parametrelerindeki semen kalitesine ilişkin terminolojiler;

Aspermi: Semen yok.

Hipospermi: <1,5 ml'den semen volümünün az olması demektir.

Hiperspermi: Ejakulat hacminin >5,5 ml olması durumudur.

Polizoospermi: > 250 milyon/ml'den sperm konsantrasyonunun fazla olmasıdır.

Ejekülatta likefaksiyon(çözünme) bozukluğu: 37 dercede 20 dakikada semenin çözünmemesi olayıdır.

Azoospermi: Sperme ejakulatta hiç rastlanmamasıdır.

Oligozoospermi: Toplam spermin alt referans değerinin <15 milyon/ ml' den az bulunmasıdır.

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

b) Şiddetli Oligozoospermi: Toplam Spermin <5 milyon/ ml'nden az olması durumudur.

Astenozoospermi: İleri hareketli sperm yüzdesinin alt referans değerinden az olmasıdır.

Teratozoospermi: Alt referans limitinden düşük yüzdede morfolojik normal spermilerin bulunmasıdır.

Oligoastenoteratozoospermi: Alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı, morfolojik olarak normal ve ileri hareketli spermilerin yüzdesi

Globozoospermi: Oval baçlı spermilerin bulunmasıdır.

Nekrozoospermi: Düşük-canlı yüzdesi fakat yüksek-hareketsiz spermelerin yüzdesinin ejakülatta bulunmasıdır.

Virtual Azospermi: Ejakülatta farklı zamanlarda spermilerin rastlanıp rastlanılmaması olayıdır.

Hematospermi: Eritrositlere ejakulatta rastlanılmasıdır.

Lökositospermi: Lökositlerin ejakülatta eşik değerin üzerinde rastlanılmasıdır (Günalp, 2008).

2.7. SEMEN TOPLANMASI

- Isı değişiklikleri sağlıklı değerlendirmeyi olumsuz etkiler. Doğal fertilizasyonda spermier 36°C'lik erkek kanallarından, 36°C'lik kadın kanallarına geçerler.
- Semen numunesi 2-7 günlük cinsel perhizden sonra toplanmalıdır.
- Numuneye ad-soyad, gün-saat, işlem numarası, perhiz aralık süresi, doğum tarihi isim ve doğum tarihi not edilir.
- Yazmak için kullanılan kalem spermotoksik özelliğinde tercih edilmemelidir.

- Numune plastik veya cam malzemeden yapılmış toksik olmayan özellikte tek kullanımlık malzemeye masturbasyonla veya özel sperm toplama prezervatiflerinin kullanımı ile toplanır.
- Numune kabı 25°C - 37°C arasındaki ortam ısısında muhafaza edilmelidir.
- Numune likefiye olurken kabı bir inkübatörde 37°C’de tutulur.
- Ejakülat tamamı alınamadıysa, bir diğer numune 2–7 günlük cinsel perhizin arkasından toplanır.
- Sperm örneği dış ortamdan laboratuara getirilecek ise vücut ısısında bir saat içinde teslim edilmesi gerekir (Orhon, 2008).

2.7.1. Makroskobik Değerlendirme

Renk: Sıvılaşmadan sonra normal bir örnek homojen ve gri-opalesan görünümde olup cinsel perhiz süresi arttıkça rengi sarımsı-beyaz renge dönüşür. Normal semen kokusu prostat bezinin salgılamasının oksidasyonu sonucu oluşurken, enfeksiyon durumunda normalden farklı kokular salgılanır. Spermin eritrositli olması ve konsantrasyonu rengi etkilemektedir(Konk, 2019).

Koagülasyon: Ejakülasyon sonrasında 15-20 dakika içerisinde semenin semisolid duruma almasıdır. Seminal veziküler ve seminogelin proteinleri sebebiyle koagülasyon oluşur. Eğer koagülasyon oluşmazsa seminal vezikülün veya vas deferensin yokluğundan şüphelenilir (Aydın Deniz, 2017).

Likefaksiyon: Seminal sıvının yeniden sıvı hale geçmesi durumudur. Normal bir semen örneğinde 37°C’de çözünme işlemi ilk 15-20 dakika da gerçekleşir ancak bazen 60 dakikayı bulabilir. Eğer sıvılaşma olmasa enzimsel veya mekanik çözüme işlemleri kullanılabilir. Prostat bezinin işlevselliğinin göstergesidir likefaksiyon. Bu olayda prostat salgısı olan PSA ile veziküler proteinlerin etkileşimi ile gerçekleşir. Böylece sperm hareketini ve konsantrasyonunu etkilemektedir (Alkol, 2020; Akbayır, 2018).

Viskozite: Likefiye olan semenden sterilize pipetle alınan numune, yerçekimi gücüyle damla damla akmaya bırakılır, damlayla pipet arasında oluan iplikçiğin boyu

20 mm'yi geçmemelidir, geçmesi durumunda artmış viskozite olduğu düşünülmektedir. Artmış viskozite sperm hareketinde azalmaya neden olur ve yapılan bir çalışmada infertil erkeklerde artmış viskozitenin görülme sıklığı %26,6 olarak bulunmuştur. Viskozite seminal veziküllerin ve prostatın sekretuar aktivitesinin göstergesidir ve artmış viskozite vezikül ve prostat fonksiyon bozukluğunu gösterir. Fonksiyon bozukluğunun pek çok nedeni olabilmekle beraber sıklıkla enfeksiyon ve inflamasyon sorumlu tutulmaktadır (Boynukalın, 2008).

Semen volümü: WHÖ kriterlerine göre ortalama semen volümü >1,5 ml olmalıdır. Semen hacminin çoğunu seminal veziküller oluşturur. Seminal veziküller alkali olup fruktoz bulundururlar (Aras, 2009).

Hacim: Ortalama 2-6 ml kadar olup semen volümü 1,5 ml'nin üzerinde olmalıdır (Boynukalın, 2008).

pH: Semen pH'ı farklı yardımcı bez sekresyonları başlıca alkali seminal veziküler sekresyonu pH:7,4 ve asidik protatik sekresyonun pH:6,4 olarak pH değerleri arasındaki dengeyi gösterir. Likefaksiyon sonrasında tercihen 30 dk- mutlak 1 saat içinde viskoz örnekler için pH metre Referans değer pH > 7,2 olmalıdır (Alkol, 2020).

2.7.2. Mikroskopik Değerlendirme

Konsantrasyon: Fertil popülasyonda bildirilen ortalama sperm sayısı mililitrede 70-100 milyon olup WHO' nun referanslarına göre olması gereken en alt limit sperm sayısı 15 milyon/ml'dir. Bu değer altı oligospermi, ejakülatta spermatozoa hücrelerinin hiç olmaması azospermi olarak adlandırılır. Sperm konsantrasyonu ile tüm ejakülata hacmi çarpıldığında ejakülattaki toplam sperm sayısına ulaşılır. Sulandırılmış semen numunesi, Konsantrasyon hesaplanırken, x200 büyütme bir mikroskopta Makler sayım kamerası kullanılır (Aslan, 2019).

Motilite (Sperm Hareketliliği): Motilite, kuyruk hareketi gösteren sperm yüzdesi olarak tanımlanır. Bunun için toplam hareketli sperm konsantrasyonu, toplam

konsantrasyona bölününerek bulunur. Likefaksiyondan sonra 1 saat içinde yapılmalıdır. DSÖ'ne göre spermler hareketliliklerine göre 4 grupta incelenir.

- a) İleri hızlı (progresif) hareketli
- b) İleri yavaş-tembel (progresif) hareketli
- c) İleri olmayan yerinde hareketli
- d) Hareketsiz spermler

WHO 'a+b' motilitenin %40'nın, sadece 'a' kalite motilitenin ise %32'in üzerinde olması gerektiğini belirtmiştir. Hareket bozukluğu (astenospermi), motilitede veya ileri harekette ya da her ikisinde de azalmayı belirtir. Bu hastalarda spermatozoanın yapısal anomalileri, uzamış cinsel perhiz süresi, genital enfeksiyonlar, anti-sperm antikorlar, varikozel, parsiyel duktal obstrüksiyon ve idiopatik faktörler sorumlu olabilir (Aras, 2009).

Yuvarlak hücre sayısı: İmmatür spermatozoalar, genitoüriner sistem epitel hücreleri, prostatik hücreler ve lökositler semendeki yuvarlak hücreleri oluşturur. Bu hücrelerden klinik olarak en önemlisi lökositlerdir. Normal semende yuvarlak hücre sayısı <5 milyon/ml olmalıdır. Yuvarlak hücre sayısı > 1 milyon/ml olduğunda lökosit sayısını değerlendirmek için myeloperoksidaz testi (Endtz testi) yapılmalıdır. Normal semende lökosit sayısı <1 milyon/ml olmalıdır (Konk, 2019).

Sperm canlılığı: Sperm hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranı <%40 olduğu durumlarda sperm canlılık testleri özellikle önem kazanır. Eozin-nigrosin veya eosin-Y testinde membran bütünlüğü bozulmuş spermler boyayı alırlar ve boyalı olarak gözlenirler, HOS testinde ise membran bütünlüğü olan spermler hipoozmolar sıvıyı hücre içine alarak şişerler ve kuyrukları kıvrık izlenir. Sperm canlılığı için en az 200 sperm hücresi sayılmalıdır. Sperm canlılığı testleri en düşük referans değeri %58'dir (Akbayır, 2018).

2.8. Spermin Morfolojik Değerlendirmesi

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için taze semende sperm başlıca "Papanicolau" yöntemi yada "Diff- Quick" yöntemiyle boyanarak elektron veya faz kontrast mikroskopuyla değerlendirilir. Sperm morfolojisi spermatogenezin kalitesini ve fertilitenin duyarlı bir göstergesidir. Baş, boyun ve kuyruğa göre sperm morfoloji anormallikleri belirlenir. Normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi WHÖ kriterlerine göre %30'u geçmelidir (Yıldız, 2019).

Sperm malformasyonlarının tipleri:

Kafa: Normali oval ve konturları düzgün olanlarıdır. Büyük veya küçük, sivri, armut şeklinde, yuvarlak, amorf, vakuollü amorf, post-akrozomal bölgede vakuoller veya küçük veya geniş akrozom alanları, çift başlılık veya bunların kombinasyonları anormaldir (Aydın Deniz, 2017; Alkol, 2020).

Orta-Parça: Normali orta parça ince, düzenli sınırlı ve yaklaşık sperm başı uzunluğunda olmalıdır. Başa asimetrik bağlantısı, kalın veya düzensiz, keskin açılı kıvrılmış, anormal derecede ince veya bunların herhangi bir şekilde kombinasyonları anormaldir (Doğan, 2008).

Kuyruk: 45 µm uzunlukta, baş uzunluğunun yaklaşık 10 katı olmalıdır. Kuyruğun kırıldığını gösteren keskin bir açı yapmadıkça, kendi üstüne geriye doğru halka şeklinde kıvrılabilir. Birden fazla sayıda olabilen, kısa boylu, kırık şekilli, düzensiz olanlar anormaldir (Güler, 2020).

Fazla sitoplazma kalıntısı: Orta kısımdan kaynaklanan spermatozoanın oluşum sürecinde büyük oranda düzensiz sitoplazmaya sahiptir (Subaşıoğlu, 2013).

2.9. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ (YÜT)

YÜT'lerin çoğu, infertil çiftlerin çocuk sahibi olmalarına yardımcı olmak için, laboratuvar şartlarında konsepsiyonu kolaylaştırmaya yarayan yöntemler olarak tanımlanır. En yaygın kullanılan YÜT'ler, IUI, IVF ve ICSI'dir. YÜT'e hazırlık için erkekten spermatozoa alınarak başlanır. Semen toplanır ve en hareketli spermier seçilerek, yıkama sonrası swim-up veya DGS ile seçilerek hazırlanır. IUI için, ovulasyon döneminde, spermatozoa uterusu insemine edilir. IVF ve ICSI için, overlerde folliküler gelişim uyarıldıktan sonra, primer oosit evresinde, oositler toplanır. İmplantasyon için birden çok embriyo elde etmek için birden fazla oosit toplanır. Daha sonra IVF veya ICSI'yi tamamlamak için sperm ve oosit kullanılır (Aydın Deniz, 2017).

YÜT merkezlerinde kullanılan teknikler:

- İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)
- İntrauterin İnseminasyon (IUI)
- In Vitro Fertilization (IVF) - Embriyo Transferi (ET)
- Gamaet İntra Fallopian Transfer (GIFT)
- Zigot İntra Fallopian Transfer (ZIFT)
- Tubal Embriyo Transfer (TET)
- POST (Peritoneal oosit ve sperm transferi) (Yıldırım, 2000).

IUI, IVF-ET ve ICSI günümüzde en sık kullanılan YÜT'dir.

2.9.1. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

ICSI tekniğı öncelikle sperm motilitesinin veya morfolojisinin spermatozanın zona pellusidayı geçmesini sağlayamadığı durumlarda, fertilizasyona yardımcı olmak için geliştirilmiştir. Bu teknik, oositin fertilizasyonuna yardımcı olmak için doğrudan oosit sitoplazmasına bir spermatozoon enjekte etmeyi içerir. ICSI ise spermatozoanın doğal konsepsiyonda karşılaştığı zorluklarla artık karşılaşmaması ve doğal seleksiyonunun olmaması nedeniyle, endişe yaratmaktadır. Doğal seleksiyon bu yöntemde engellendiğinden, başarılı bir hamilelik gerçekleşmesi için iyi bir DNA'ya

sahip, canlı bir spermatozoanın oositin içine enjekte edilmesi gerekir (Aydın Deniz, 2017).

2.9.2. İntrauterin inseminasyon (IUI)

Çeşitli tekniklerle hazırlanmış konsantre hale gelmiş spermilerin direkt olarak uterin kaviteye transfer edilmesidir. IUI endikasyonları; servikal faktör, ovulatör disfonksiyon, erkek faktörü ve açıklanamayan infertilitedir. IUI diğer tekniklere göre daha az invaziv, daha ucuz ve daha basit olduğu için ilk başvuru olan yöntemdir. Vajinaya spekulum yerleştirilmesi ile serviks tespit edilir. İnseminasyon kateteri endometrial kaviteye gönderililerek içerisinden hazırlanmış sperm kaviteye enjekte edilir (Kara Ö. , 2011).

2.9.3. In Vitro Fertilization (IVF) - Embriyo Transferi (ET)

Gelişen folikülden ovulasyon döneminde oositlerin çıkartılması ve normalde ejakülden normal değil ise cerrahi işlemle elde edilen spermilerin laboratuvar şartlarında bir tüp içerisinde fertilizasyonunun sağlanması işlevidir. Bu işlemi takiben gelişen embriyolar intrauterin kaviteye enjekte edilir. ICSI'nun 1992'de keşfedilmesi ile erkek infertilitesinde YÜT'de başarı oranı artmıştır. ICSI yönteminde ince pipetle bir spermin oosit sitoplazmasına enjekte edilmesiyle döllenme oluşturulur (Durgun Ozan, 2013).

2.9.4. Gamet Intra Fallopian Transfer (GIFT)

Ovumun tüpler içerisinde sperm ile karşılaştırıp fertlize olma olasılığının artırılmasını amaçlayan teknik çeşididir. Bu teknikte ultrasonografiyle vajinal yöntemle oositler toplanır sonrasında ise laparoskopik veya laparotomik yöntemle toplanan sperm hücreleri tüplere yerleştirilir. Semende en az 2 milyon sperm bulunmalıdır bu yüzden diğer tekniklere göre GIFT'in kullanımı daha azdır (Yıldırım, 2000).

2.9.5. Zigot Intrafallopian Transfer (ZIFT)

GIFT yöntemine benzer şekilde toplanan yumurta ve sperm hücresinden in vitro şartlarda fertilizasyonu ile embriyonun uterusu değil tüplere laparoskopi veya laparotomi ile yerleştirilmesi işlemidir. İşlem için sağlam tüplere ihtiyaç duyulur (Işıkçı, 2012).

2.11.6. Tubal Embriyo Transferi (TET)

Tubaya embriyo değilde zigotun transfer edilmesi işlemidir (Dinçel, 2019).

2.9.7. Peritoneal Oosit ve Sperm Transferi (POST)

Direkt pelvis boşluğuna yumurta ve spermelerin bırakılması işlemidir (Yıldırım, 2000).

2.10. SPERM HAZIRLAMA (YIKAMA) YÖNTEMLERİ

IUI, IVF ve ICSI işlemlerinde sperm hücrelerinin kullanıma hazır hale getirmek için yapılan işlemlere sperm hazırlama denilmektedir.

Sperm Hazırlama Tekniklerinin Amacı:

- Seminal plazmanın sperm hücrelerinden uzaklaştırılması,
- Spermden prostaglandin ve diğer inhibitörlerin uzaklaştırılması,
- Toksik bioaktif maddelerin (ROS-serbest oksijen radikalleri gibi) uzaklaştırılması,
- Olgun olmayan sperm öncü (immatür germ) hücrelerinin, lökositlerin ve epitel hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması,
- İleri hızlı hareketli (progresif-hareketli) spermelerin sayısının artırılması,

- Spermilerin total motilitesinin ve iyi morfolojili sperm sayısının arttırması,
- Hepatit B ve Hepatit C virüsü ile enfekte erkek hastalarda viral yükün azaltılmasıdır.

Tüp Bebek uygulamalarında alternatif sperm yıkama yöntemleri:

- Sperm washing (yıkama)
- Yoğunluk Gradient Tekniği (DGS)
- Swim-up Tekniği
- Zeta Tekniği
- Manyetik Aktive Sperm Seçimi Tekniği (MACS)
- Hyaluronik Asit Bağlanma Tekniği
- Elektroforez Tekniği
- Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi Tekniği(MSOME)
- Çift Kırılma Tekniği
- Mikro-akışkan Teknolojiler

2.10.1. Sperm Washing (Yıkama)

Tekniğin amacı, spermatozoanın seminal plazmadan uzaklaştırılarak istenilen bir hacimde yoğunlaştırılıp elde edilmesidir. Bu teknik albümin içeren kültür medyumları ile semenin 1:1 oranlarda konik dipli steril bir tüpte karıştırılıp 10 dk 400 g'de santrifüj edilmesi esasına dayanır. İlk santrifüjden sonra süpernatant atılır ve elde edilen pelletin üzerine tekrar taze kültür mediumu eklenip pipetting yapılır ve daha sonra 5 dk. 300g'de santrifüj işlemi tekrar edilir. Bu santrifüj işleminden sonra yine süpernatant atılır ve pellet mediumla homojenize edilerek kullanıma hazır hale getirilir. Bu metotun dezavantajı lökosit ve debrislerinden arındıramamış yüksek konsantrasyonda sperm sayısına ulaşılır (Işık, 2019; World Health Organization, 2010).

2.10.2. Dansite-Gradyent(Yoğunluk) Santrifüj (DGS) Tekniğine Göre Sperm Hazırlanması

Bu teknikle morfolojisi düzgün kaliteli ileri hareketli spermleri ayrıca hasara uğramamış DNA'lı spermleri seçmek, seçilen spermleri diğer hücre tiplerinden ve hücre debrisisinden ayırt edilmesini sağlar. DGS yöntemi solüsyon içerisinde belli bir lokasyonda sperm hücrelerini toplanmaktadır. Morfolojik yönden normal ve anormal görünümlü olan spermlerin dansiteleri birbirinden farklıdır. Düzgün, normal, kaliteli, olgunlaşmış spermlerin yoğunluğu $>1,12$ g/ml iken anormal ve olgunlaşmamış spermlerin yoğunluğu ise 1,06-1,09 g/ml değerleri arasındadır. Swim-up tekniğine göre daha tutarlı sonuçlar alınmaktadır çünkü standardize edilmesi daha kolaydır. ICSI ve IVF için sperm elde edilmesi için genellikle bu yöntem kullanılır. Bu teknik de, seminal plazma dansite gradyanlarına göre santrifüjlenir. Bu teknikte, hücrelerin dansitelerine göre silan bulunduran dansite gradyanları gruplandırır. Sonuçta spermlerin hareketli olanları yüzerek gradyan materyali içerisinde geçerek tüpün dip kısmında pellet meydana getirir. Genellikle çok kullanılan kesintili iki kademeli DGS tekniği, anormal morfolojili, düşük motiliteli ve immotil sperm hücreleri % 40 (v/v) dansiteli üst katman ile normal morfolojiye sahip, motil ve canlı sperm hücreleri % 80 (v/v) dansiteli alt katmandan meydana gelir. DGS tekniği ile işlenen sperm numuneleri; hücre debrisisinden, lökositler, germ dışı hücreler ve dejeneratif germ hücrelerinden ayıklanmış iyi morfolojide kaliteli, yüksek hareketli spermlerin ele geçirilmesini sağlar (Buran, 2015; Günalp, 2008).

DGS yöntemi ile sperm elde etmenin avantajları; çok sayıda ve temiz motil sperm elde edilmesi, sperm konsantrasyonu düşük örneklerden sperm eldesinin sağlanması, yüksek verimlilikle sperm hücrelerinin elde edilmesi, ejakulattaki sperm dışı debris ve hücrelerden temizlenmesi, ROS'ni azaltır, standardizasyonun daha kolay olması, kronik viral hastalıklarda diğer tekniklerden daha etkin olması, DNA fragmentasyonuna sahip sperm oranını azaltması olarak sayılır. Dezavantajı ise; pahalı bir teknik olması, endotoksinlerin risk oluşturması, uzun ve zahmetli bir yöntem olmasıdır (Tezcan, 2017).

2.10.3. Swim-up Yöntemi

Swim-up yönteminin çeşitli varyasyonları mümkündür.

2.10.3.1. Direkt swim-up (DSW) tekniği

Sperm hücrelerinin seminal plazmadan dışarıya, kültür medyumu içine doğru yüzme hareketi yeteneğine göre seçilmesi swim-up yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemin uygulanmasına başlanmadan önce semen örneği seyreltilmemeli ve santrifüjleme işlemi yapılmamalıdır. Aksi halde, sperm membranlarında peroksidatif hasara neden olabilmektedir. DSW hareketli spermleri ayırtmada çok kullanılan bir tekniktir. Likefiye haldeki semen üstüne kültür medyumu eklenir veya kültür medyumunun altına sıvılaşmış semeni yayarak DSW uygulanır. Bir saat inkübeden sonra kültür medyumu içine doğru hareketli spermler yüzerek hareket ederler. Bu teknikte, washing tekniğine göre sperm motilitesine göre seçim yapıldığından daha az sayıda sperm eldesi sağlanılsa da elde edilen kaliteli hareketli sperm yüzdesinin düşük olduğu IVF ve ICSI durumlarında avantajlıdır (Konk, 2019).

2.10.3.2. Konvansiyonel swim-up (CSW) tekniği

Konvansiyonel swim-up yönteminde inkübasyon öncesi spermler santrifüj işlemiyle çöktürülürler. Standart semen numunesi santrifüj tüpüne koyularak üzerine de yıkama medyumu eklenir 10 dakika 100 Rpm de santrifüj edilerek süpernatant ayrıştırılır. 0,5 ml yıkama medyumu pellet üzerine ilave edilerek 45°'lik açıyla %5 CO₂ 36°C'de ortamda yaklaşık bir saat tutulur sonrasında pipetle üst katmana doğru yüzen 1 ml'lik örnek alınır. Konvansiyonel teknikler motil ve morfolojik yönden iyi görünümlü spermleri ayıklamada avantajlı olsalar da, DNA bütünlüğü tam olan spermleri ayıklamada eksik kalmaktadır (Işık, 2019).

2.10.4. Zeta (Elektrokinetik) Potansiyeli Tekniği

Spermin zeta potansiyeli, sperm membranı ve çevresi arasındaki elektriksel potansiyel olup yaklaşık -16 mV ile -20 mV arasında olup kapasitasyonla birlikte

azalmaktadır. Bu teknikde; yıkanmış semen numunesi pipet yardımıyla pozitif yüklü santrifüj tüpünün içine eklenerek, birkaç kez tüp hafifçe karıştırılıp bir dakika sonra santrifüj edilir. Sonrasında tüp kenarına yapışmayan sperm ve diğer hücreler uzaklaştırılır. Zeta tekniğinde, bir elektroforez ekipmanına gerek olmadığından maliyeti daha düşük, daha güvenli ve yapılması daha kolaydır. Bu teknik, dondurup-çözülen sperm örneklerinde de başarılı olarak uygulanmış fakat oligozoospermik gibi az sayıdaki sperm örneklerinde dezavantajlıdır. Zeta yöntemleri, DGS yöntemi ile karşılaştırıldığında, toplanan spermelerin, morfolojisinin normal, normal kromatin yoğunluğuna sahip ve DNA bütünlüğünün yüksek, motilitesinin ise düşük olduğu gözlenmiştir. Bu tekniğin dondurularak saklanan numunelerin sonrasında DNA bütünlüğü sağlam spermeleri ayıklamada tercih edilebileceği belirtilmiş ve ICSI ile döllenme yüzdelerini artırmıştır. Zeta tekniğinin dezavantajları ise; negatif yüklü X kromozomlu spermelerin seçiminde yanlı davranabilir ve ayrıca proteinlerin hızla azalmasından dolayı etkileri kaybolacağından kısa sürede çok hızlı işlem yapılmalıdır (Bulgurcuoğlu Kuran & Altun).

2.10.5. Manyetik Aktive Sperm Seçimi Tekniği (Magnetic-Activated Cell Sorting System) (MACS)

Sperm membranının dış katman yüzeyinde yer alan fosfatidilserinin (PS), eksternalizasyonu erken apoptozisin bir özelliğidir. Bu teknikte sperm hücresinin seçimi apoptotik olmayan yollarla MACS kullanılır. Anneksin V'ye bağlı paramagnetik mikrobeadlere bağlanarak PS'nin eksternalizasyon durumunda spermelerin apoptotik olanları işaretlenerek ayrıştırılması gerçekleşir. İlk işlem olarak Anneksin V-konjuge mikrobeadlerle spermin heterojen hücre konsantrasyonu inkübe edilir sadece eksternalize fosfatidilserininli spermelerin apoptotik olanlarının be beadlere bağlanır. Mıknatısı bead-spermin içine konulup MACS kolonundan geçirilir. Bu sayede mıknatıs mikrobeadli işaretlileri çeker, işaretlenmemiş hücreler ise sistemden ilerleyerek ayrıştırma sağlanır. Germ hücreleriyle lökositler MACS ile ayrılmadığından DGS ile birlikte uygulanmaktadır (Tüfekçi & Başar, 2014).

ICSI ile yapılan son alışmalar, MACS ile veya MACS olmadan hazırlanan sperm örneklerini kıyaslandığında, örneklerde fertilizasyon oranları, normal gebelik, kaliteli embriyo, implantasyon oranları, doğum oranları arasında anlamlı bir farkın olmadığını gösterdi. Bu teknik yalnızca sınırlı sayıdaki örnekle değerlendirildiğinden ICSI etkinliği konusunda karara varmak için önce daha büyük örneklem çalışmalarla değerlendirilmelidir (Özkavukçu & Aras, 2017).

2.10.6. Hyaluronik Asit Bağlanma Tekniği

Hyalüronik asit (HA), ovidukt ve seminal sıvıdan salınan reproduktif sistemde kumulus ovoforus'un hücre dışı matriksinin ana bileşenidir. Medyuma HA'ın bağlanması yeni ejakulatın ve kriyoprezervasyonun canlılığını, motilitesini, hareketini arttırdığı bildirilmektedir. Sperm plazma membranındaki HA bağlama kısımları, sperm olgunluğunu işaret etmektedir. HA'ya bağlı spermi seçmek için fizyolojik intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (PICSI) ve sperm-slow prosedürü de dahil olmak üzere iki teknik vardır; her iki teknik öncesinde sperm yıkama veya santrifüjleme yoluyla sperm hazırlığı aşamalarını gerektirir. Spermin seçilebilmesi için, Dr. Hussar ve arkadaşları tarafından PICSI dish olarak isimlendirilen HA'nın sabitlendiği 4 işaretili kutucuğun olduğu bir ürün geliştirilmiştir. PICSI petrileri mineral yağ altında inkübasyona bırakılır ve HA noktasının kenarına yıkanan spermden alınan bir damla damlatılır. HA'ya bağlanmış spemler yaklaşık 15 dk sürecinde spermler baş kısımlarıyla HA'yla kaplı mikronoktalara bağlanarak hızlı baş bölgesi etrafında kuyruklarını hareket ettirerek dönerler. En hareketli bağlanan spermler ICSI için enjeksiyon pipeti yardımıyla toplanarak oosite bırakılırlar (Yagcı, 2013; Boynukalın, 2008).

2.10.7. Elektroforez Bazlı Sperm Seçimi Tekniği

Elektroforez (Microflow CS-10), spermlerin taşıdıkları elektronegatif yüklerine ve büyüklüğüne göre seçilmesi metoduna dayanan bir teknolojidir. Olgunlaşmış spermlerin yüzeylerinde CD52 antijeni ve glikolize fosfotidilinositol taşıdığından yükü negatiftir. Normal sperm morfolojisiyle kapasitasyonu CD52 antijeninin, doğru

orantılı arttığı bilinmektedir. Elektroforez cihazı, bir bölmeye bir semen örneğinin yerleştirilerek bir voltaj uygulandığı ve morfolojik olarak normal, negatif yüklü sperm hücrelerinin, 5µm polikarbonat membran boyunca pozitif elektroda doğru ilerlediği böylelikle olgunlaşmamış sperm, immatur germ hücrelerini ve lökositleri geride bıraktığı bir kasetten oluşur. Mikrofluidik sistemlere benzeyen bu yöntem hızlıdır ve kısa sürmektedir. Bu teknikle işlevsel spermler uygun porlardan geçebilmekte; böylece işlevsel, morfolojik ve genetik olarak normal sperm hücreleri seçilmektedir. Elektroforez ile DGS arasında, DNA bütünlüğü, sperm morfolojisi ve motilitesi arasında anlamlı bir fark saptanmamaktadır. Ayrıca elektroforezle sperm seçiminde, santrifüj işlemi yapılmadığından, ROS maruziyetindeki azalma nedeniyle daha az oksidatif DNA hasarı oluşur. Özellikle kriyoprezervasyon işleminden sonra elektroforetik tekniklerden olumlu neticeler alınmıştır ancak sperm hareketliliğinin olumsuz etkilenmesi uygulamanın düşündürücü yanını ortaya çıkarmıştır. Teknikte kullanılan malzemenin kompleks yapıda olması günlük rutinde olumsuz etki yaratır (Bulgurcuoğlu Kuran & Altun; Aydın Deniz, 2017).

2.10.8. Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi Tekniği (Motile Sperm Organellar Morphology Examination) (MSOME)

Motil sperm organellerinin morfolojik değerlendirilmesi yöntemiyle hareketli spermlerin donanımlı mikroskoplarla x6000-8000 kata kadar büyütme yapılarak sperm morfolojisi analizidir. İlk kez Bartoov ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu teknik sayesinde spermlerin ayrıntılı yapısal özelliklerine ulaşılmıştır. Sperm oranı düşük erkek infertil hasta gruplarında MSOME tekniği kullanılarak YÜT'e destek sağlanır. MSOME ile sperm anormalilerinin yanında baş içerisindeki anormali yapı ve vakuelleri ortaya çıkarır. Nükleusda vakuole rastlanması durumunda DNA yapısında hasar olduğunu gösterebilir. Çünkü vakuol bulunan spermler ile bulunmayanlara oranla DNA hasar oranı daha yüksek çıkmıştır. DNA'daki bu hasarlarda fertilizasyonu ve embriyo gelişimini olumsuz etkilemektedir. Spermin diğer kısımlarından boyun ve kuyruk kısımlarına da bakılarak bilgi edinilir. Yüksek kalitedeki sperm MSOME tekniği ile seçilerek ICSI ile beraber birleşerek intrasitoplazmik morfolojisine göre seçilen sperm enjeksiyonu (IMSI) ortaya çıkıp

YÜT'e katkı sağlanmış olur. IMSI ile yapılan çalışmalarda implantasyon, fertilizasyon ve embriyo gelişiminde başarılar kaydedilmiştir (Tüfekçi & Başar, 2014).

2.10.9. Çift Kırılma Tekniği

Spermin çift kırılımı polarize lenslerin olduğu bir inverted mikroskop kullanılarak değerlendirilen optik sistemdir. Spermin hareketliliğini, konsantrasyonunu ve canlılığını olumsuz yönde etkilemeden ICSI işleminde reaktif akrozomlu kaliteli spermin ayıklanması gerçekleştirilir. Ek ekipmanla teknik tecrübeye ve zamana gerek duyulur. Bu teknikle ağır erkek faktörlü olgularda elde edilen reaktif akrozomlu spermin, akrozomsuz sperme oranla daha yüksek gebelik oranı elde edilmiştir (Bulgurcuoğlu Kuran & Altun; Aydın Deniz, 2017).

2.10.10. Mikro-akışkan Teknolojiler ve Mikro-akışkanlarla Sperm Hazırlama Teknikleri

Geleneksel yöntemlerde spermelerin uzun süre inkübe edilmesi ve santrifüj işlemi sonucunda, spermelerde kromatin hasarına yol açabilen ROS miktarının artması ve bu sebeple DNA yapısında bozulmaların olduğu görülmüştür. Sperm DNA hasarı da IVF ve YÜT başarı oranlarını olumsuz yönde etkileyen bir faktör olduğundan, ROS miktarını arttırmayacak sperm chip gibi yöntemler geliştirilmiştir (Bulgurcuoğlu Kuran & Altun).

Sperm chipin amacı IVF veya ICSI esnasında kullanılacak DNA bütünlüğü tam, normal morfolojik görünümlü, olgun, ileri hareketli spermi seçmeyi sağlamaktır. Bu teknikte doğal ortama benzeyen mikrokanallardan oluşmuş çip şeklindedir. Mikroçipte, 1.5 mm kalınlığında polimetilmetakrilat kombinasyonu (PMMA) ve 50 mikron kalınlığında çift taraflı yapışkan (DSA) film mikroakışkan kanalları meydana getirilir. Mikroakışkan kanal ortamı serum ile desteklenmiş, taze human tubal fluid (HTF) medium ile önceden doldurulmuştur. Sperm örneği sütunun en üst kanal girişine pipetle yüklenir ve sonrasında belirli uzunluktaki kanal boyunca spermelerin

yüzmesi beklenir. Kanal boyutu uzadıkça DNA fragmentasyonu olan sperm geride kalarak kanaldan geçişi engellenmektedir. Yüzen spermier diğier uçtan toplanarak ICSI için kullanılır (Akbayır, 2018).

Mikroakışkan cihazın kolay kullanımlı, tekrarlanabilir ve güvenilir olması avantajı, ekstra ayrı bir aparat olarak maliyeti ise dezavantajıdır. Sperm örnekleriswim-up ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak düşük ROS ve DNA parçalanma oranlarının olduğu gösterilmiştir (Yüksel, 2019).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ETİK KURUL İZNİ

Bizim çalışmamız 2019-2020 yılları arasında “Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezine” çocuk istemi ile başvuran, erkek hastalarda retrospesifik olarak uygulandı. Çalışma önce “Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Yerel Etik Kurulun’a” sunuldu ve 17.06.2021 ve 333 sayılı etik kurul onayı alındı. Çalışmaya primer infertil daha önce YÜT uygulanmamış olan hastalar dahil edildi (Ek 1, 17.06.2021 tarih ve 333 sayılı Etik Kurul Kararı).

3.2. ÇALIŞMA PLANI VE HASTA SEÇİMİ

Çalışmamızda 60 çift yer almaktaydı, ardışık 2 ART tedavisinin birinci denemesinde sperm hazırlama tekniği SU olup gebelik elde edilemeyen ve sonraki denemesi Sperm Chip olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Her iki uygulamada da laboratuvar koşulları, kullanılan embriyo kültür ve medyumları, sperm immobilizasyon medyumları, kümülüs hücreleri ayıklama medyumları, sperm enjeksiyon iğneleri ve oosit sabitleme iğneleri (holding iğneleri) aynıydı. Her iki uygulamanın ICSI işlemi aynı embriyolog tarafından gerçekleştirildi. Çalışmamızda beşinci gün elde edilen blastasist sayıları ve beşinci gün dondurulan blastosist sayılarında sperm hazırlama teknikleri arasında karşılaştırılacaktır. Dolayısı ile beşinci gün yeterli sayıda blastosist elde etmemiz için çalışmamıza dahil ettiğimiz kadın hastaların 42 yaşından

küçük olması ve ICSI işleminde en az 5 adet MII oosite sahip olmasına dikkat edildi. ÜYTE merkezimizde daha önce yapılan tedavilerde erkek hastalarda sperm hazırlama için Sperm Chip yöntemini kullandığımızda, 1 milyondan/ml dan az sperm sayısına sahip hastalarda yeterli sayıda sperm elde edilemediğini tecrübe ettik. Bu yüzden çalışmaya sperm sayısı 1 milyondan/ml dan az olan erkek hastaları dahil etmedik. ART sikluslarında her iki denemede de akut veya kronik hastalıkları olan çiftler çalışmaya daha edilmedi. Çalışmaya dahil edilen hasta sayısı akış şeması Tablo 2 de belirtilmiştir.

Kadın hasta seçim kriterleri;

- 20-39 yaş aralığında olması
- En az 1 yıl istemesine rağmen gebe kalamamış olmak.
- Hastanın erkek faktörlü infertilite grubunda olması

Erkek hasta seçim kriterleri;

- 20-45 yaş aralığında olup spermalarında hareket ve/veya sayıca azalma tespit edilmiş olması
- Sperm sayısı; >1milyondan
- Sperm hareketliliğinin %32'den az olması

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri kadın ve erkek için aşağıda belirlenmiştir.

Kadın için;

- 20-39 yaş aralığının dışında olan kadınlar
- 3'ten fazla sayıda IVF başarısızlığı olanlar
- Endometriozisi ya da endometriomasi olan hastalar

Erkek için;

- 20-45 yaş aralığının dışında kalan erkekler
- Sperm sayısı 1 milyon altında olan erkek hastalar
- Sperm hareketliliği %32 den fazla olan erkek hastalar
- OPU gününde sperm veremeyip, cerrahi yöntemle sperm alınan hastalar

3.3. KULLANILAN DENEY EKİPMANLARI

3.3.1. Santrüfj

30 t p mevcutlu devir hızı 4000 rpm'e kadar artan 99 dakikalık zaman ayarlayıcı santrifüj çeşidi tercih edildi.

3.3.2. Otomatik pipetör

Otomatik pipet rlerin 200,1000  l kapasiteli olanları tercih edildi.

3.3.3. Mikroskop

Preparat incelenmesinde binoküler ışık mikroskobu tercih edildi.

3.3.4. Flow Kabin

Partikül tutma özellikli filtreli, floresanlı-UV ışığa sahip steril kabinler; hücre ekiminin işleminde ve test solüsyonlarının hazırlanmasında tercih edildi.

3.3.5. İnkübatör

37 C'de semenin inkübe edilmesinde tercih edildi.

3.3.6. Konik T p

Mavi kapaklı vidalı 15 ml'lik falcon tüpler tercih edildi.

3.3.7. Mikro Akışkan  ip

Sperm ayıklanması sırasında tercih edildi.

3.4. SEAH TÜP BEBEK MERKEZİ ANDROLOJİ LABORATUARINDA UYGULANAN SEMEN DEĞERLENDİRİLMESİ

3.4.1. Makroskobik Değerlendirme

Likefaksiyon: Alınan semen numunesi koagüle durumda olduğundan 30-60 dakika aralığında homojen hal alması için beklenir.

Semen hacmi : Total sperm sayısına hacim miktarıyla belirleneceğinden dikkatli bir şekilde dereceli pipet sayesinde ölçüldü. Alt referans sınırı semen hacminin 1,5 ml'dir.

Semen viskozitesi: Alınan semenin likefaksiyondan sonra pipetle aspirasyonu ile damlamaya bakılarak ölçümü yapıldı.

Ejakülatın görünümü: Homojen görünümlü gri-opak renkli likefiye semen numunesinin görülüp görülmediğine bakıldı.

3.4.2. Makler Sayım Çemberinde Semen Mikroskobik Değerlendirilmesi

WHO kılavuzundaki semen parametrelerine bakılarak semen analizleri değerlendirildi.

3.4.3. Konsantrasyon (Dansite) Ölçümü

Hastadan alınan semen örneğinin likefaksiyon sonrası homojenizesi sağlandıktan mikropipetle aspirasyonu sonrasında 15 µl miktarı makler sayım çemberine bırakıldı. Sperm sayımı için mikroskobun 20X'lık objektifinin tablasına semen koyulduktan sonra maklerin 10 dikey-10 yatay kareleri sayılarak sperm sayısı bulundu ve yazılarak tespit edildi. Gerçek konsantrasyonu bulmak için elde edilen spermin yarısı 10^6 /ml ile çarpıldı.

3.4.4. Total Sperm Sayısının Hesaplanması

Toplam sperm sayısı tüm ejakülat hacminin sperm konsantrasyonu ile çarpılarak elde edildi.

3.4.5. Motilitenin Değerlendirilmesi

30-60 dakika aralığında likefaksiyon sonrasında motiliteye bakıldı. Hareketli ve hareketsiz spermeler makler sayım çemberindeki karelerde sayılarak yüzde oranı bulundu ayrıca progresif-nonprogresif motiliteyle değerlendirildi. WHÖ'nün semen kılavuzuna göre motilite a,b,c,d gruplarına bakılarak sperm motilitesi değerlendirildi. Toplam motilite için alt referans sınırı %40 iken, ileri hareket için alt referans sınırı %32'dir.

3.5. SEAH TÜP BEBEK MERKEZİ ANDROLOJİ LABORATUARINDA KULLANILAN SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

ICSI için tüm semen örnekleri “Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Merkezi Androloji Laboratuvar'ında” hazırlandı. Hastanın eşinden 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası, işlem günü laboratuvarında semen örneği alındı. Sperm yıkama yöntemi olarak tüm hastaların çalışma kapsamında alınan sperm örneklerine “Swim-up” ve “Sperm Chip” yöntemlerinin ikisinde uygulandı. İşlem sonrası hazırlanan sperm solusyonları tedavi amacıyla (IUI veya IVF/ICSI) kullanılmadı.

3.5.1. Swim-Up Yöntemi

Swim-up tekniğinin uygulanabilmesi için yeterli sayıda motil sperm olması gerekir çünkü spermeler kendi hareketliliği ile semenden ayrılır. Bu amaçla;

- Semen örnekleri 30 dakika kadar etüvde bekletilerek likefiye olması sağlandı sonrasında sperm yıkama işlemine alındı.
- Bazal semen örneğinden 5 µL alınarak işlem öncesi sperm sayı ve motilitesi mikroskopla incelendi.

- Yapılan incelemeden sonra semen swim-up yöntemiyle yıkandı. Swim-up tekniğine yani progresif motiliteye sahip spermelerin medyum içerisinde yüzdürülmesi yöntemine semen örneğini 15 ml falkon konik tüpe konularak başlandı.
- Üzerine 1/1 oranında sperm yıkama medyum (Sperm Rinse Solusyonu, Vitro Life, İsveç) tüplerin dibindeki pelet bozulmadan pipetle yavaş yavaş ilave edildi.
- Pipetleme işlemi sonrası örnek 10 dakika boyunca 500 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı.
- Süpernatantlar pelete zarar vermeden pipet yardımıyla alınarak atıldı.
- Tüp sonra 45 derecelik açı ile spora dikkatlice yerleştirilip, pelet üzerine 0,5 ml sperm yıkama medyum (Sperm Rinse Solusyonu, Vitro Life, İsveç) eklendi. Açı bozulmadan 37°C sıcaklıkta %6 CO₂ neme doymuş inkübatörde 30 dakika-1 saat inkübe edildi.
- Supernatant'dan pipetle bir miktar çekilerek, sperm sayı ve motilitesi tekrar mikroskopla incelenerek kaydedildi.
- Son olarak, tüpün açısı bozulmadan pastör pipet yardımı ile toplam 0,5 ml olacak şekilde tüp yüzeyinden süpernatantlar çekilerek ICSI için kullanılmak üzere falcon 5 ml tüpe aktarıldı.

3.5.2. Mikroakışkan Çip Yöntemi

Bu teknikte semene herhangi bir ön işlem yapılmadan likefiyeden sonra en sağlıklı kaliteli sperm seçimi için sırayla yapılan işlemler;

- Steril bir mikro pipet yardımıyla, 13 µL' lik sperm sorting solüsyonu, mikro akışkan çipi inlet giriş portuna eklendi ve ardından 2 µL sıvılaştırılmış sperm örneği aynı porta yavaşça eklendi.
- Daha sonra yaklaşık 2 µL mineral oil outlet portuna üzerine buharlaşmaya karşı sperm hücrelerini korumak için eklendi.
- Aynı amaç ile inlet portu üzerinde mineral oil ile kaplanacak ve yaklaşık 30 dakika 37 derece inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra, mineral yağın altındaki outlet portundan çözelti içeren sperm hücreleri invert mikroskop altında incelendi.
- Sperm hücreleri ICSI işlemi için hazır hale gelmiş oldu.

3.6. TÜP BEBEK MERKEZİNDE KADINA UYGULANAN IVF/ICSI İŞLEM BASAMAKLARI

3.6.1. Kontrollü Hiperstimülasyon ve ICSI Prosedürü

Kontrollü yumurtalık stimülasyonu için Antagonist protokol (Cetrotide; Serono) kullanıldı. Gonadotropin dozu, hastaların over rezervi ve kullanılan gonadotropinlere karşı overleri verdiği yanıtı göre tespit edildi. İnsan koryonik gonadotropin (HCG) enjeksiyonu en az iki folikül ortalama çapı 17 mm'ye ulaştığında yaklaşık 11 gün süren aşama sonucunda uygulandı. HCG enjeksiyonunu takiben 32-36 saat sonra transvajinal-USG ile genel anestezi altında oositler toplandı (Özcan, et al., 2021).

3.6.2. Yumurta Toplama İşlemi (OPU-Oosit Pick-Up)

Hormonal ilaçlar ile büyütülen oositlerin kan testi ve ultrason görüntüleriyle ölçülüp ilaçtan yaklaşık 10-12. günler arasında foliküler uygun boyuta ulaşınca hastaya kalçadan HCG enjeksiyonu yapılır. Yaklaşık 34-36 saat sonra hekim kontrolünde ameliyathanede anestezi altında transvajinal ultrasonla vajinaya takılan ultrason probuyla ovaryum görüntülenir. Vajenden ovaryuma doğru ilerletilen steril opu iğnesiyle 10 mm'den büyük folikül içerisindeki sıvı aspire edilir. Steril ve toksik olmayan tüp içerisine alınan folikül sıvısı birkaç saat inkubatörde bekletilir. Daha sonra opu petrilere 37°C'lik ortamda folikül sıvısı boşaltılır ve burada korona-kumulus kompleksi (COC) içerisinde oositler uygulanacak işlem için temizlenir. Mikroskopla olgun kaliteli spermier değerlendirilerek ayrı bir kap içerisine önceden 37°C' de ısıtılmış medium içine alınarak olumsuz fiziksel şartlardan uzaklaştırıldı.

3.6.3. Oosit Denüstasyonu ve Matürasyon Tayini

OPU işleminden 2-3 saat sonra oositin etrafındaki kumulus ve granülozo hücreleri ICSI işlemi için ayıklandı. Daha önce hazırlanıp ısıtılmış hyaluronidaz enzimi bulunduran medyum içerisine kumulus-oosit kompleksi atılarak enzimsel işleme tabi tutuldu. 30-60 sn beklemenin ardından steril pipetle yavaşça karıştırılan kompleks enzimatik yolla dağıldı. Oositin dışında kalan granula hücreleri daha küçük pastör pipetiyle mekanik temizliği yapıldı. Ayıklanan oositler medyum içerisine alınarak mikroskopta incelenerek kutup cisimciğini atmış metafaz-II (MII) aşamasındaki oositler ayrıldı ve ICSI işlemine kadar 37°C'de inkübede dinlenmeye bırakıldı. Ayrıca metafaz-I aşamasında olanlar MII aşamasına geçmesi beklenerek işleme alındı fakat germinal veziküllü olgunlaşmamış oositler kullanılmadı.

3.6.4. Mikroenjeksiyon İşlemi

İnvertod mikroskobun 40x objektifinin altında ısıtıcı tablası 37°C'de mikro enjeksiyon işlemine başlandı. Polivinilpirolidon (PVP) maddesi spermeleri yavaşlatmak için kullanılır.

Swim-up tekniği ile ayıklanmış spermeler;

- Swim-up'lı sperm drobundan kardeş oositlerin yarısı oosit droplarına bırakıldı.
- ICSI pipetiyle seçilen spermeler, PVP drobuna alınarak kuyruk kesimiyle hareketsizleştirildi.
- Hareketsizleşen bu sperm aspire edildi, holding pipet yardımıyla oosit tutuldu ve kutup cisimciği saat 12 hizasında sabitlendi.
- ICSI pipetiyle spermatozoa oosit içerisine bırakıldı ve birkaç kez aspire edilerek oosit aktivasyonu oluşturuldu.
- Sırasıyla ICSI petrisindeki bütün oositler için aynı işlem gerçekleştirildi.
- İnkübe kültür petrilere mikroenjeksiyon yapılan oositler alındı, dışına hasta bilgileri ve swim-up tekniği yazıldı ve inkübatöre (37°C , %5 CO₂ ve %5 O₂) alındı.

Mikroakışkan çip ile ayıklanmış spermeler;

- Çipli sperm drobundan kardeş oositlerin kalan diğer yarısı oosit droplarına bırakıldı.
- ICSI pipetiyle seçilen spermeler, PVP drobuna alınarak kuyruk kesimiyle hareketsizleştirildi.
- Hareketsizleşen bu sperm aspire edildi, holding pipet yardımıyla oosit tutuldu ve kutup cisimciği saat 12 hizasında sabitlendi.
- ICSI pipetiyle spermatozoa oosit içerisine bırakıldı ve birkaç kez aspire edilerek oosit aktivasyonu oluşturuldu.
- Sırasıyla ICSI petrisindeki bütün oositler için aynı işlem gerçekleştirildi.
- İnkübe kültür petrilere mikroenjeksiyon yapılan oositler alındı, dışına hasta bilgileri ve sperm chip tekniği yazıldı ve inkübatöre (37°C , %5 CO2 ve %5 O2) alındı.

3.6.5. Embriyo Kültürü

ICSI işleminden 16-18 saat sonra mikroskopta pronükleus varlığına göre fertilizasyon kontrolü yapıldı. Fertilize oositler bir gün önceden hazırlanmış tek aşamalı yeni kültür medyumunda inkübasyona bırakıldı. Hasta özellikleriyle elde edilen embriyo sayısına göre embriyo transfer günleri belirlendi. Embriyolar üçüncü günde kalitelerine daha önce yapılan çalışmalara göre derecelendirildi. Embriyo kültürüne 5. güne kadar devam edildi. Transfer durumu ve dondurulacak embriyoların kararı blastosist skor derecelendirilmesine göre gerçekleştirildi. Embriyoların morfolojilerine göre hastalara uygun 3, 4, ve 5. günlerde transferleri yapıldı.

4.BULGULAR

4.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

SPSS 24.0 paket programı (SPSS Inc. ve LeadTech. Inc. Chicago. ABD) kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Verilerin normal dağılımı için Kolmogorow-Simirnow testi kullanıldı. Çalışmamızda sperm hazırlama teknikleri olan SU ve Sperm Chip teknikleri hasta çiftlerine uygulamıştır. İki sperm hazırlama tekniğinin kıyaslanması durumu söz konusu olduğu için normal dağılım gösteren bağımlı olmayan gruplar Bağımsız t testi kullanılarak karşılaştırıldı. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu. Sonuçların $p<0,05$ olanları anlamlı olarak değerlendirildi.

4.2. SONUÇ

Çalışmamıza 60 erkek faktörü endikasyonu olan hastaları dahil ettik. Hastalarımızın 30 tanesine Swim-up (SU) diğer 30 tanesine ise Sperm Chip tekniği kullanılmıştır. Her iki sperm hazırlama tekniğinin IVF tedavilerine sağladıkları katkıları karşılaştırdık.

Çalışmamızdaki Swim-up grubundaki kadınların yaş ortalaması 32.01 ± 0.96 ; erkeklerin yaş ortalaması ise 35.02 ± 0.98 'dir. Sperm Chip grubundaki kadınların yaş ortalaması 31.45 ± 0.23 , erkeklerin yaş ortalaması ise 34.07 ± 0.45 'dir. Swim-up grubundaki kadınların BMI ortalaması 24.7 ± 5 erkeklerin BMI ortalaması ise

28.1±3'tür. Sperm chip grubundaki kadınların BMI 25.2±4 iken erkeklerin BMI 29.8± di. İki farklı sperm ayırıştırma yönteminde edavide kullanılan total gonadotropin miktarı, sperm konsantrasyonu, sperm morfolojisi, total sperm hareket ve progresif sperm hareketleri arasında istatistiksel olarak bakıldığında anlamlı bir fark görülmedi($P>0.05$) Tablo-2. Sperm ayırıştırma yöntemleri arasında sperm parametreleri ve oosit hazırlığında kullanılan gonadotropin miktarları arasında anlamlı farkların görülmemesi, çalışmadaki laboratuvar ve klinik sonuçları daha doğru bir şekilde karşılaştırmamıza yardımcı oldu.

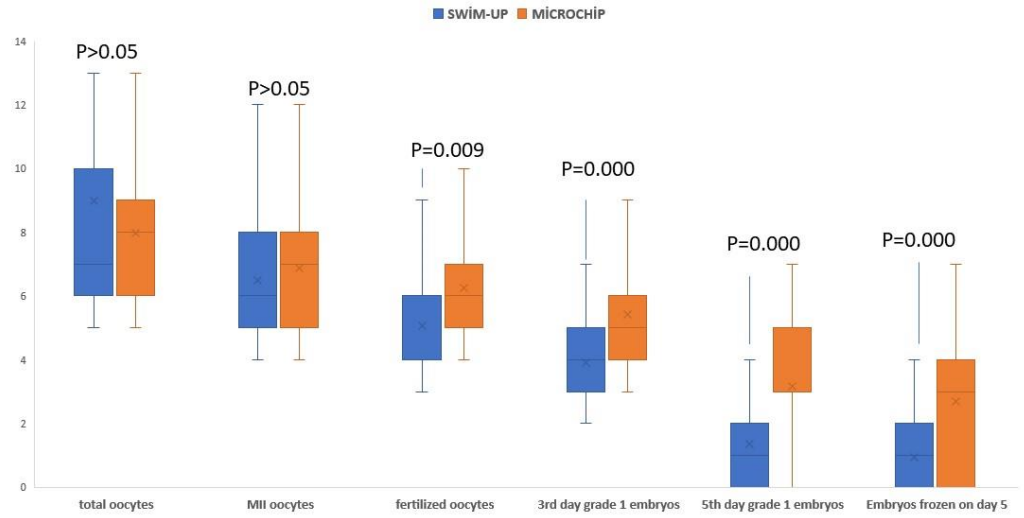
Tablo 2: Çalışmada ardışık iki denemede kullanılan total gonadotropin ve sperm parametreleri karşılaştırılması

Parametreler	Swim-up	Mikroçip	P value
Total Gonadotropin	2405±73	2556,41±69	$P=0.181$
Sperm konsantrasyonu	32.5±4.3	33.1±4.1	$P=0.872$
Total sperm hareketi	58.3±3	62.1±2.4	$P=0.346$
Progresif sperm hareketi	45.3±2.6	46.2±2.1	$P=0.811$
Sperm morfolojisi(%)	1.2±0.2	1.1±0.4	$P=0.121$

Analizler bağımsız t testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak $p<0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda iki farklı sperm hazırlama yöntemi ile denemeye ait, toplam oosit, M-II oosit sayısı, fertilize oosit sayısı, 3. ve 5.gün kaliteli embriyo sayıları, 3. ve 5. gün dondurulan kaliteli embriyo sayıları ile ilgili karşılaştırmalar Şekil 1'de sunulmuştur. İki grup arasında toplanan toplam oosit, MII oosit ve 3.gün dondurulmuş embriyo sayıları arasında istatistiksel olarak bakıldığında anlamlı fark görülmemiştir ($P>0.05$). Fertilize oosit sayıları, 3.gün iyi kalite embriyo sayısı, 5.gün iyi kalite embriyo sayıları ile 5.gün dondurulmuş iyi kalite embriyo sayıları arasında ise Sperm Chip tekniği yönünde anlamlı farklar görüldü (Şekil1).

Şekil 1: Gruplar arası oosit ve embriyo değerlerinin karşılaştırılması.



İki grup arasında toplanan oosit, MII oosit sayıları arasında fark görülmedi. Fertilize oosit, 3., 5.gün iyi kalite embriyo sayıları ile 5.gün dondurulmuş iyi kalite embriyo sayıları arasında anlamlı farklar görüldü. Bağımsız t testi ile analiz yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi ($p<0.05$).

SU grubunda 6 hasta, Sperm Chip grubunda 7 hastaya ET yapılmayıp dondurulduğu için implantasyon ve gebelik değerlendirilmelerine alınmadılar. SU grubunda 29 vakadan 8 tanesinde implantasyon pozitiflik görüldü. Fakat bunlardan sadece bir tanesinde gebelik oluşmasına rağmen ilerleyen haftalarda düşük ile sonuçlandı. Sperm Chip yönteminde, 28 vakadan 9 tanesinde implantasyon pozitiflik görüldü. Bu vakalardan 5 tanesinde Sperm Chip yöntemleri ile hazırlanan vakalarda sırası 6 tanesinde gebelik pozitif oldu ve 3 tanesinde gebelik görüldü. Gruplar arasında implantasyon ve gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmedi ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu retrospektif randomize çalışmamızda, erkek infertilitesi nedeniyle ICSI planlanan hastaların tedavileri sırasında sperm seçiminde kullanılan tekniklerden Sperm Ciph kullanımının klasik konvansiyonel SU tekniğine göre IVF tedavileri üzerine etkilerini araştırdık. Bu karşılaştırmada fertilize olmuş yumurta sayısı, elde edilen kaliteli embriyo sayısı, gebelik oranları gibi parametreleri karşılaştırdık.

Erkek kaynaklı infertilite, şuanki infertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde infertilitenin tek sebebi görülüyorken, %30-40'nda kadın infertilitesiyle birlikte etki ettiği bilinmektedir. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde semen analizi önemli bir parametre olup ilk ve temel standarttır. Elde edilen spermin motilite, morfoloji, canlılık, DNA bütünlüğü, apoptoz ve maturite gibi sperm parametreleri, YÜT başarısının kritik belirleyicileri arasına girmektedir. Son dönemde sperm DNA'sında oluşan hasarın embriyo kalitesinde düşmeye, normal fertilizasyon oranının düşmesine ve IVF uygulamalarında başarısızlığa neden olan temel faktör olabildiğinin bilimsel yayınlarla da ortaya çıkarılmıştır. Bu sebeple tüp bebek tedavilerinde ileri düzey sperm seçim tekniklerinin çok büyük önem taşıdığı ve bu

teknikler sayesinde kaliteli sağlıklı spermatozoaların ayrıştırılarak ICSI işleminde çalışılmaktadır. MACS, İMSİ ve çift kırılma gibi ileri yeni düzey sperm ayıklama tekniklerinin çoğunda, DNA bütünlüğünün tam fakat DNA hasarının az olduğu spermelerin ayrıştırılması çalışmaları yapılmış embriyo kalitesi, fertilizasyon oranı ve gebelik üzerine etkisinin olup olmadığı gösterilmiştir (Gode, et al., 2019).

İleri düzey sperm seçme yöntemlerinden biri olan Sperm Chip teknolojilerinin kullanılarak yapılan çalışmalarda genel yargıya henüz net olarak varılamamış olsa da çalışılan konulardan biridir. Klinik araştırmalarda geleneksel tekniklerde tercih edilen santrifüjleme, pipetle karıştırma ve yıkamanın ROS üretmesi sonucu olarak sperm canlılığına negatif etki, DNA bütünlüğünün bozulması ve DNA hasar oranının artmasına sebep olduğu bilinmektedir. İn vivo ortamdaki gibi doğal yollarla sperm seçme yolları geleneksel yöntemlerle atlanır spermelerde DNA fragmentasyonuna neden olabilir. Sperm Chip ise kimyasal ve ROS oluşmasına neden olabilecek santrifüj işlemi yerine, öncesinde herhangi bir ön işlem basamağına gerek kalmadan spermelerin in vivo şartlardaki doğal işleyişine bezeyen şekilde rahim boynu ve fallop borularından geçerek oosite varmaya çalışır gibi taklit ederek çip kanallarından ilerler. Sonuçta daha az ROS oluşumuna yol açtığı, elde edilen spermelerin DNA bütünlüklerinin daha yüksek ve DNA fragmentasyonlarının daha düşük olduğu söylenmektedir. Spermin motilite, vitabilete ve hız oranları klinik uygulamalarda diğer tekniklere göre daha yüksek ve daha iyi morfolojiye sahip oldukları gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda Sperm Chip kullanmamızdaki amaç, SU tekniği gibi spermin ortamdan kendi hareketliliğiyle sıyrılmasını sağlamak hem de DGS tekniğine gibi iyi morfolojideki spermeleri ayıklayarak böylelikle geleneksel yöntemlerin avantajlı yönlerini kullanmış olmaktır (Yalçinkaya Kalyan ve ark 2019).

2003 yılında Cho ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Sperm Chip tekniğiyle ayrıştırılan spermelerin daha iyi kalitede ve vitabilitede elde edilmiştir (Cho et al 2003).

Sperm Chip tekniğinde DNA fragmentasyonu bakımından kaliteli sperm seçtiğine yönelik çalışmalar varken ICSI klinik sonuçları ile ilgili yayına rastlanılmamaktadır.

Bu sebepten dolayı çalışmamızda, erkek faktör sebebiyle infertilite tedavisi alan hastalarda Sperm Chip uygulamasında ayıklanan spermelerin ICSI işleminde fertilize oosit sayıları, kaliteli embriyo sayıları ve gebelik sonuçlarına etkisini araştırdık.

ART alanındaki yeni teknolojik gelişmelerden etkilenmiştir. Bu yeni tekniklerden biriside spermın biyofizyolojik ve biyokimyasal çevresini taklit edip doğal fizyolojik sperm seçimine daha fazla imkan sağlayan Sperm Chip yöntemidir (Lara-Cerrillo, et al., 2021). Bizde çalışmamızda, sperm hazırlama yöntemi SU ve Sperm Chip olan hastalarımızın laboratuvar ve klinik sonuçlarını karşılaştırdık. Spermın hareketlilik, morfoloji gibi özelliklerine uygun olarak farklı tipte mikro çip tipleri ART tedavilerinde kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda sperm hareketlilik özelliğine göre sperm izole eden tipini kullandık (Samuel, et al., 2018). Sperm Chip'in hareketlilik özelliği için kullanılan tipi, sperm ayırtırmada prensip olarak SU tekniğine benzerlik göstermektedir. Fakat Sperm Chip'in uzun dar kanalları ve sıvı akışı gibi özellikleri SU yöntemi ile farklılık gösterir (Gode, et al., 2019).

Sperm Chip uygulamasının klinik sonuçlara katkısı hala açık olarak ortaya konulamamıştır(Samuel, et al., 2018) . Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda Sperm Chip'in ART tedavilerinde implantasyon ve klinik gebelik sonuçlarının yanında fertilizasyona, kaliteli embriyo elde edilmesine, beşinci gün embriyo sayısına ve beşinci gün dondurulan embriyo sayılarına katkısını inceledik. ART tedavilerinde yüksek oranda fertilizasyon elde etme, kaliteli embriyo sayısını artırma tek bir nedene veya duruma bağlı değildir. Sperm hazırlama yöntemleri ve iyi bir sperm izolasyonu fertilizasyona ve kaliteli embriyo elde edilmesinde direkt etki eden koşullar arasında önemli bir yere sahiptir. Literatürde yeni teknolojilerin embriyo kalitesini etkilediğini araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Özcan, et al., 2021; Yalçinkaya Kalyan ve ark 2019; Yetkinel, Kılıçdağ Bulgan, Aytaç Çağlar, Haydardedeoğlu, Şimşek, & Cok, 2019). İnvert mikroskopun yenilik olarak kullanıldığı bir çalışmada, invert mikroskop yardımı ile sperm seçiminin klasik ICSI yöntemine göre daha kaliteli embriyo sayısı ve devam eden gebeliklerin artışına neden olduğu bildirilmiştir (Gianaroli L. , et al., 2010). Biz çalışmamızda son dönemlerde sperm hazırlama yönteminde yenilik olan Sperm Chip yöntemi ile

konvansiyonel olarak uzun süredir kullanılan SU yöntemini karşılaştırdığımızda; Sperm Chip yöntemi ile fertilizasyon oranlarının, 3. ve 5. gün kaliteli embriyo sayılarının arttığını gözlemledik. Fakat implantasyon ve klinik gebelik oranlarında bir farklılık olmadığını gözlemledik. Literatürde çalışmamıza benzer olarak Sperm Chip ve SU yöntemlerinin ART tedavilerine katkılarını karşılaştırarak değerlendiren sadece iki çalışma bulunmaktadır. Bizim çalışmamıza benzer olarak bu çalışmalar birisinde; Sperm Chip yönteminin SU yöntemine göre kaliteli embriyo sayısını arttırdığını, gebelik sonuçlarına etki etmediği bildirilmiştir (Yetkinel, et al., 2019). Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada Sperm Chip yönteminin fertilizasyon oranlarına bir katkı sağlamadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada transfer edilen embriyoların günleri hakkında eksik bilgiler verilmiştir. Diğer çalışmada ise Sperm Chip ve SU yöntemleri karşılaştırılmış bu iki uygulamada ise laboratuvar ve klinik bulgular arasında bir farklılık bulmadıklarını bildirmişlerdir. Nihayetinde Sperm Chip uygulamasının bir fayda sağlamadığını belirtmişlerdir (Yalçinkaya Kalyan ve ark 2019). Fakat bu çalışmada Sperm Chip yöntemi ile sperm hazırlama sürecinde Sperm Chip, chip üretici firma çalışma prosedüründen farklı zaman süreçleri kullanılmıştır. Bu durum çalışma sonuçlarına etki etmiş olabilir.

IVF ve ET uygulamasında, embriyoloji laboratuvarlarında yüksek kaliteli embriyolarını seçmek için güncel yöntem 3.gün embriyolarının kalite kriterlerine bağlıdır (Wang, et al., 2016). Bu kriter genellikle döllenmeden sonra 3. gün embriyodaki hücre sayısına, simetriye ve fragmentasyon derecesine dayanır (Awadalla, Vestal, McGinnis, & Ahmady, 2021). 3. gün kriterinde, 8 blastomer içeren embriyolar tercihen taze embriyo transferleri için seçilir, çünkü yüksek oranda blastosist oluşumu ve klinik gebelik üretirler (Awadalla, Vestal, McGinnis, & Ahmady, 2021). Bunun nedenleri blastosist embriyo transferinin bölünme evresi embriyo transferlerine göre avantajları, 5. Gün embriyolarının daha düşük aneuploidi riski taşımaları ve endometriyum ile fizyolojik senkronizasyonun daha yüksek olması sayılabilir (Glujovsky, Farquhar, Quinteiro Retamar, Alvarez Sedo, & Blake, 2016; Neyer, et al., 2015). Ek olarak, blastosist evresindeki embriyoların transferleri embriyonun kontrollü overyan stimülasyonundan sonra östrojen ve progesteron süper fizyolojik seviyelerine erken dönemde maruz kalmasını önlediği varsayılmaktadır

(Quinn, et al., 2018). Bu avantajların yanında, bölünme evresi elde edilen embriyo sayısı ile embriyo kültürünün ilerletilip blastocyst aşamasına uzatılması arasında elde edilen embriyo sayısı arasında farklar bulunmaktadır (Fernández-Shaw, Cercas, Braña, Villas, & Pons, 2015). Dolayısı ile transfer sonrası kalan embriyo sayıları veya all freze embriyo için blastosist evresine kadar uzatılan sikluslarda her embriyo blastosiste aşamasına kadar gelişemediğinden dolayı daha az embriyo elde edilebilir. Bu yüzden transferin geciktirilip geciktirilmemesi veya embriyo kültürünün blastosist aşamasına kadar ilerletip ilerletmemek konusunda hala kalıcı bir tartışma bulunmaktadır (Fernández-Shaw, Cercas, Braña, Villas, & Pons, 2015). Bizim çalışmamızda beşinci gün elde edilen blastosist embriyo sayısı Sperm Chip grubunda SU grubuna göre daha yüksekti. Benzer bir çalışmada ise Sperm Chip ve SU grupları arasında blastosist aşamasında elde edilen embriyolar arasında anlamlı fark elde edememişlerdir (Yalçınkaya Kalyan ve ark 2019). Yetkinel ve ark. Sperm Chip yöntemi ile SU yöntemine göre daha çok sayıda kaliteli embriyo elde etmişler fakat embriyo günleri hakkında net bir bilgi vermemişlerdir (Yetkinel, et al., 2019). Sperm Chip kullanımının kaliteli sperm seçiminde yardımcı olarak, fertilizasyon sonrası embriyo kültürünün blastosist aşamasına kadar ilerletilmesindeki çekinceleri azaltacağını düşünmekteyiz.

Son yıllarda kriyoprezervasyon yönteminin embriyo survival oranlarının yüksek olması nedeniyle, embriyo dondurma-çözdürme işlemlerinde vitrifikasyonun slow-freezing yöntemine tercih edilmesine neden oldu (Wong, Mastenbroek, & Repping, 2014). Fernandez-shaw ve ark. vitrifikasyonlu dondurma-çözdürme sikluslarında kümülatif gebelik oranlarının, blastosist embriyoları kullanıldığında bölünme evresi embriyolarına göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirdi (Fernández-Shaw, Cercas, Braña, Villas, & Pons, 2015). Taze ve çözölmüş IVF siklusları embriyo transferi planlanmasında kümülatif gebeliğin oranlarının blastosist aşamasına kadar ilerletilen vakalarda daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Glujovsky, Farquhar, Quinteiro Retamar, Alvarez Sedo, & Blake, 2016). Çalışmamızda, taze IVF döngülerinin 5. gün embriyo transferinden sonra, Sperm Chip grubunda SU grubuna göre daha fazla grade1 embriyo kaldı. Kalan embriyolar daha sonraki freeze-thaw sikluslarında kalacak şekilde donduruldu. Çalışmamıza benzer şekilde transfer

sonrasında Sperm Chip tekniği SU tekniğine göre daha fazla embriyo dondurulduğunu bildirilen çalışmalar bildirilmiştir (Yetkinel, et al., 2019). Bizim çalışmamıza karşı olarak dondurulan 5. Gün embriyo sayıları arasında Sperm Chip ve SU gruplarında bir fark görülmediği bildirilmiştir (Yalçınkaya Kalyan ve ark 2019). Çalışmamızda Sperm Chip yönteminin Freeze thaw sikluslarında kullanılmak üzere daha çok 5. Gün embriyosu sağladığını gözlemledik. Böylelikle Sperm Chip ile ET yapılan veya freze all sikluslarda daha fazla kaliteli embriyo elde dilmesinin ART sikluslarında gebelik elde etmede yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

Sperm seçimi ile ilgili bir çalışmada, blastosist evresine uzatılacak embriyo kültürlerinde blastosist elde edilme oranlarında üçüncü gün ve sonrasındaki dönemde paternal etkilerin daha belirleyici olduğu sperm seçiminin hafife alınmaması gerektiği bildirilmiştir (Neyer, et al., 2015). Sperm Chip yönteminde, spermatozoayı daha yüksek DNA bütünlüğü ile ayırıtırdığını düşünülmektedir (Quinn, et al., 2018). Bu durumun blastosiste gitme oranlarını arttırdığını düşünmekteyiz. Ayrıca Sperm Chip yönteminin, kullanımlarının yüksek sperm DNA fragmentasyonu nedeniyle meydana geldiği düşünülen düşük oranlarını azaltmak için yararlı olabileceği bildirilmiştir (Carlini, et al., 2017; Kumar, et al., 2012). Biz alışmamızda bu bilgiler doğrultusunda klinik olarak, kaliteli embriyo elde etmede sıkıntısı olan male faktör endikasyonu taşıyan iftlerimize Sperm Chip yöntemini önermekteyiz. Sperm Chip yöntemi kullanılan denemelerde gebelik oranlarında çok yüksek cevaplar alamasak da Sperm Chip kullanılan sikluslarda elde edilen kaliteli embriyo sayıları oldukça arttığını gördük. Kaliteli embriyoların dondurulmasının ART denemelerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Dondurulan embriyolar daha sonraki denemelerde gebelik elde edilmesinde uygun endometrium ve luteal faz desteği ile gebelik sayılarının arttıracığını düşünmekteyiz.

2008 yılında Gineroli L. ve arkadaşlarının yaptığı bir klinik çalışmada 112 kişi ile sağlıklı, oligoastenospermik ve testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) rnek spermlerinden çift kırılma yöntemiyle seçilerek ICSI tekniği kullanılmıştır. Aynı kriterlerde 119 kişi kontrol grubunda spermler geleneksel teknikle seçilerek ICSI uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda döllenme oranları kontrol grubunda %72 iken,

Çalışma tarafında %74 saptanarak aralarında istatistiksel fark görülmemiştir. Hatta gruplar arasında klivaj oranlarında da bir farka rastlanmamıştır. Grade 1 embriyo oluşumu çalışma grubunda %33 iken, kontrol grubunda %20 bulunarak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,025$). Transfer edilen embriyo sayılarıyla gebelik oranlarında anlamlı bir fark saptanamamış fakat abortus yüzdeleri çalışma grubunda %16 iken, kontrol grubunda %41 bulunarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,035$). Gebeliğin devam ettiği durumlarda oranlar çalışma grubundaysa %23 iken, kontrol grubunda %11 olarak saptanmıştır ($p<0,025$) (Gianaroli L. , et al., 2008).

2013 yılında Teixeira DM. ve arkadaşları tarafından hazırlanan cochrane çalışmasında ICSI ve IMSI tedavilerinin başarıları kıyaslanmış olup bunun için 2008-2012 arasında yayınlanan 9 tane klinik araştırma derlenip toplanmıştır. Meta-analiz sonucunda klinik gebelik hariç canlı doğum, düşük ve konjenital anomaliler arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Dokuz randomize kontrollü klinik çalışmada 2014 kadın hasta sonucunda yalnız gebelik oranları IMSI tekniğinde ICSI'ye göre fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (RR 1.29, %95 CI 1.07- 1.56 $I^2=57$) (Teixeira, et al., 2013).

2013 yılında Gil M. ve arkadaşlarının Sperm Chip kullanımının sonuçları hakkında 5 randomize çalışma kıyaslanarak derleme ve meta-analiz çalışması yapılmıştır. Bu araştırma neticesinde gebelik oranları 367 hasta araştırılarak gebelik oranlarını Sperm Chip kullanımının etkilediği sonucu istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (RR=1.50, 95 % CI 1.14–1.98 $I^2=4$). Yapılan iki araştırmada toplam da 834 hastayla çalışılmış implantasyon oranlarında 49 olarak istatistiksel fark saptanmış. Düşük oranları yalnız tek bir çalışmada rapolanmış 60 hastayı içeren çalışma grubunda istatistiksel bir fark saptanmıştır (Gil, Sar-Shalom, Sivira, Carreras, & Checa, 2013).

2017 yılında ESHRE kongresinde poster olarak O. Alagöz ve arkadaşlarının yapmış olduğu retrospektif bir çalışmada Sperm Chip tekniği ile DGS karşılaştırılmış. Fertilizasyon ve implantasyon oranları açısından iki grup arasında istatistiksel bir

fark bulunmamış fakat Sperm Chip grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha çok sayıda gebelik rapor edilmiştir ($p=0,03$). Yapılan çalışma detaylı olarak incelendiğinde hastaların ilk IVF siklusu olan ya da daha önce bir defa IVF siklusu olan hastalar, daha önce iki ya da üç IVF siklusu olanlar, daha önce dört ya da daha fazla IVF siklusu olan hastalar olarak gruplandırılarak ayrılmıştır. Gruplar arası gebelik, fertilizasyon ve implantasyon oranları incelendiğinde, iki-üç IVF başarısızlığı olan grupta gebelik ve implantasyon oranlarının arttırdığı ($p=0,01$ ve $p=0,02$) sonucuna ulaşılmıştır (Alagöz, Özkara, Koçer Yazıcı, & Ficicioğlu, 2017).

2017 yılında ESHRE kongresinde poster olarak sunulan, S. Ramakrishnan ve arkadaşları tarafından yapılan, sperm ayırıştırma tekniklerinden DGS tekniği ile Sperm Chip kıyaslamasında, Sperm Chip'in işlenmiş numunede DNA fragmentasyon endeksini (DFE) önemli ölçüde azalttığını ve DGS grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur ($p<0,05$) (Ramakrishnan, Balasubramanyam, Amita, & Kumar, 2017).

2017 Dünya IVF Kongresinde G. Özkara ve arkadaşları tarafından poster olarak sunulan; Sperm Chip kullanımının blastokist gelişimine etkisiyle ilgili yapılan çalışmada toplam 364 hastada sperm seçme yöntemi olarak Sperm Chip kullanımının DGS tekniğiyle kıyaslanarak blastokist gelişimine etkisine bakılmıştır. Çalışma verilerinin kıyaslanmasında, hasta yaşı, toplanan oosit ve MII oosit sayıları, fertilizasyon oranları ve sperm sayıları ile total hareketlilik, progresif hareketlilik oranı, kruger kriterlerine göre morfolojisi normal sperm oranı yakın değerlerde saptanmıştır. Blastokist gelişimi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,08$) (Özkara, Alagöz, İsmiçoğlu, Koçer Yazıcı, & Fıçıcıoğlu, 2017).

2017 Dünya IVF Kongresinde G. Özkara ve arkadaşlarının retrospektif olarak yaptıkları çalışmalarında, düşük sayıda sperm değerlerine sahip hastalarda Sperm Chip kullanımının blastokist gelişimine olan katkısı DGS tekniği kıyaslanmıştır. Oligozoospermi hastalarında DGS grubunda blastokist gelişimi $\%40,69\pm28,05$ saptanırken Sperm Chip grubunda ise $35,91\pm25,42$ olarak saptanmış olup aralarında

istatistiksel fark saptanmamıştır($p=0,45$). Astenozoospermi hastalarında ise DGS grubunda blastokist gelişimi $41,49 \pm 28,46$ saptanırken ve Sperm Chip grubunda ise $37,81 \pm 31,09$ olarak saptanmış olup iki grup arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p=0,54$). Teratozoospermi hastalarında da DGS grubunda blastokist gelişimi $41,59 \pm 28,07$ ve Sperm Chip grubunda $37,87 \pm 25,64$ olarak saptanmış olup iki grup arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p=0,26$). Sonuç olarak da sperm değerleri düşük hastalardan oligozoospermi, astenozoospermi ve teratozoospermi gruplarında sperm yıkama yöntemi olara Sperm Chip kullanımının DGS tekniğine göre blastokist gelişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Özkara, Alagöz, İsmiçoğlu, Koçer Yazıcı, & Fıçıcıoğlu, 2017).

2017 yılında Aydın Deniz Ş. tarafından yapılan çalışma sonucunda, MII oosit sayıları ve embriyo sayıları kontrol grubunda Sperm Chip kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek olmasına rağmen her iki grupta transfer edilen grade-1 ve grade-2 embriyo sayıları arasında istatistiksel fark görülmemiştir. Ancak tolanan total grade 3 embriyo sayısını, kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Sperm Chip tekniğiyle seçilen spermle yapılan ICSI işlemi sonrası düşük kalitedeki embriyo sayısının, istatistiksel olarak anlamlı derecede az olması, tezimizi desteklemektedir (Aydın Deniz, 2017).

2018 yılında Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada blastokist kalitesi araştırılmıştır. Mükemmel, iyi, ortalama ve kötü embriyo dereceleri için klinik gebelik oranları sırasıyla %65,0, %59,3, %50,3 ve %33,3; canlı doğum oranları ise sırasıyla %50,0, %49,7, %42,3 ve %25,0 idi. Hem klinik gebelik oranı ($\chi^2 = 21,28$, $P = 0,001$) hem de canlı doğum oranı ($\chi^2 = 13,50$, $P < 0,001$) genel blastosist derecesi ile arttı. Her iki oran da A dereceli veya B dereceli TE ve benzer şekilde A dereceli ICM sergileyen bir blastosistin transferinden sonra, C dereceli TE ve/veya C dereceli TE sergileyen bir blastosistin transferinden sonra önemli ölçüde daha yüksekti ICM. Blastosist genişleme derecesinin klinik gebelik veya canlı doğum oranı üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Zhao, You, & Zhang, 2018).

2018 yılında Quinn ve ark. tarafından yapılan çalışmada DGS ve Sperm Chip tekniklerini kıyaslamışlardır. İşlenmemiş numunelerde medyan DFI %21'dir (çeyrekler arası aralık (IQR): 14-30). Tüm numunelerin eşleştirilmiş analizlerinde, Sperm Chip tarafından işlenenler, DGS santrifüjleme ile işlenenlere ($P = 0.0029$) saptanmış ve işlenmemiş numunelere ($P < 0.0001$) kıyasla önemli ölçüde azalmış DFI gösterdi. Çip numuneleri için medyan DFI %0 (IQR: 0-2.4) iken, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile işlenenlerin medyan DFI'si %6'ydı (IQR: 2-11). En yüksek DFI çeyreğindeki (DFI aralığı: %31-40) işlenmemiş numuneler, yoğunluk gradyanlı santrifüjlemeden sonra %15'lik bir medyan DFI'ya (IQR: %11-19) ve sonrasında %0'lık bir DFI'ya (IQR: %0-1.9) sahipti. Sperm Chip ile işleme ise ($P = 0.02$) olarak saptandı. Bu çalışmaya göre Sperm Chip yönteminde DFE oranının DGS'ye oranla çok azaldığını fakat klinik gebelik oranlarına bakılmamıştır (Quinn, et al., 2018).

2019 yılında Yetkinel ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada tüp bebek tedavisinde spermatozoon seçimi için 61'i geleneksel SU (kontrol grubu) ve diğer 61'i Sperm Chip teknik (çalışma grubu) ile tedavi edilen açıklanamayan infertiliteye sahip 122 çift dahil edildi. Fertilizasyon oranları ve embriyoların kalitesi çalışmanın birincil sonucu ve klinik gebelik (CPR) ve canlı doğum oranları (LBR) ikincil sonuçlarıydı. Çalışma grubu ve kontrol grubunda CPR sırasıyla %48.3 ve %44.8 ($p = 0.35$) ve LBR sırasıyla %38.3 ve %36.2 ($p = 0.48$) idi. Döllenme oranları benzerdi (%63.6 ve %57.4, $p = 0.098$). Toplam 1. derece embriyo sayısı, Sperm Chip teknik grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksekti (1.45 ± 1.62 'ye karşı 0.83 ± 1.03 , $p = 0.01$). Çalışma grubunda dondurulacak daha fazla kaliteli embriyo vardı (0.71 ± 1.48 vs. 0.22 ± 0.69 , $p = 0.02$). Çalışma sonucunda açıklanamayan infertilitesi olan çiftlerde tüp bebek tedavisi sırasında Sperm Chip tekniğin fertilizasyon, CPR ve LBR'yi değiştirmediğini göstermiştir. ICSI tedavisi sonrası toplam 1. derece embriyo sayısı ve embriyo transferi sonrası 1. derece embriyo fazla sayısı Sperm Chip teknik grubunda daha yüksek olmasına rağmen, çalışma bu farkı tespit edecek güçte değildi (Yetkinel, et al., 2019).

2019 yılında Yalçınkaya ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer prospektif çalışmada 72 hastadan elde edilen toplam 1075 olgun oosit dahil edildi. Sperm Chip ve SU tekniği kontrol grubu olarak çalışılmış ayrıştırılan spermatozoaların kardeş oositlerine ICSI yapılarak sonuca bakılmıştır. Çalışmanın ana sonuç ölçütü toplam blastosist gelişme oranı iken, diğer sonuç ölçütleri (fertilizasyon oranı, blastosist gelişme hızı, embriyo kalitesi, gebelik ve implantasyon oranı) ikincil sonuçlar olarak gruplar arasında karşılaştırıldı. Pelet yüzdürme yöntemi, çalışmamızda tek katmanlı santrifülemeye göre daha yüksek blastosist edinimi (toplam blastosist gelişimi ve blastosist kullanım oranı) göstermesine rağmen, aradaki fark istatistiksel anlamlılık göstermemiştir ($p > 0.05$). Ayrıca fertilizasyon, embriyo gelişimi, 2. gün embriyo kalitesi, gebelik ve implantasyon oranları bakımından aralarında anlamlı bir farklılık saptanmamış ($p > 0.05$). Verilerimiz, her iki yöntemin de blastosist kullanımı ve implantasyon oranları açısından karşılaştırılabilir etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Yalçınkaya Kalyan ve ark 2019).

2019 yılında Yıldız tarafından yapılan çalışmada hem DGS hem de Sperm Chip tekniklerinin kaliteli morfolojideki sperm sayısının yükseldiğini gözlemlemişler. Ayrıca yapılan araştırma da kontrol grubuna göre 30 örnekli DGS grubunda DFE oranının 13 saptanırken; Sperm Chip grubunda ise DFE oranı 7 olarak saptanmıştır. Böylece DGS yönteminde DFE oranı artmış, Sperm Chip yönteminde ise anlamlı ölçüde azalmıştır. Çalışmaya alınan hasta kriterlerinde en az 2 YÜT tedavisi olup da klinik gebeliğin oluşmadığı 92 olguda DGS ve Sperm Chip tekniklerine göre fertilizasyon ve klinik gebelik oranlarında anlamlı fark rastlanmadı ($p < 0,05$). Bu sonuç elde edilen bilgileri diğer çalışmalarla birlikte doğrulamaktadır. Fakat yapılan çalışmada bu hasta kriterlerinde Sperm Chip tekniği klinik gebelik oranlarında fark yaratmasada fertilizasyon oranlarında anlamlı fark yarattığından YÜT çalışmalarında bu tekniğin kullanılması alternatif bir yöntem olarak tercih edilebilir (Yıldız, 2019).

2020 yılında Güler tarafından yapılan çalışmada Sperm Chip'in, asthenoteratospermi olgularında tercih edilebileceği araştırıldı. Bu hasta gruplarındaki spermleri DGS ve Sperm Chip tekniği kullanılarak ayrıştırıldı ve oositlere ICSI gerçekleştirildi. Yapılan

diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında döllenmede ve 3. Gün embriyo gelişiminde fark g r lmesede, embriyo gelişiminin 5. g n ndede kaliteli sağlıklı blastokist bakımından aralarında anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.029$) (Güler, 2020).

6. SONUÇ

Çalışmamızda Sperm Chip tekniğinin erkek faktör infertilitesi endikasyonlu ART tedavilerinde implantasyon ve gebelik sonuçlarını olumlu şekilde katkı sağlamadığı. Fakat ICSI sonrası fertilizasyon oranı, kaliteli embriyo sayısı ve dondurulan beşinci gün embriyo sayılarını arttırdığı görüldü. Dondurulan embriyo sayısının daha fazla olmasının infertil çiftlere bebek elde etmek için yeni bir şans oluşturacağı gibi maddi olarak destek sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Ancak hasta sayımız sınırlı olduğundan, daha yüksek sayıda çalışma gruplarıyla daha fazla özellik dikkate alınarak yapılan analizlerle desteklenmesi gerekmektedir. Bu sebeple ileri düzey sperm seçimi araştırmaların devamı uygun olacaktır.

KAYNAKÇA

- Acar, E. G. (2020, Ocak). Yüksek Lisans Tezi. '*İdiyopatik Erkek İnfertilitesi ile Seminal Plazma HSP90-ALFA Protein Düzeyi Arasındaki İlişkinin Araştırılması.*' Samsun, Türkiye.
- Akbayır, M. (2018). Yüksek Lisans Tezi. '*Sperm DNA Fragmantasyonu %30'un Üzerinde Olan Hastaların Mikrochip ve Tesa Yöntemleriyle Elde Edilen Spermiler İle Yapılan Mikroenjeksiyon İşlemi Sonucu Embriyo Gelişim Hızı, Kalitesi ve Gebelik Sonuçlarının Karşılaştırılması.*' Ankara, Türkiye.
- Alagöz, O., Özkara, G., Koçer Yazıcı, M. G., & Ficicioğlu, C. (2017). 'Improving Pregnancy Rate in IVF Cycles by Preparing Sperm via Microfluid Sperm Chips.' *Yeditepe University Hospital, ESHRE'17 Poster.*
- Alkol, S. (2020). Yüksek Lisans Tezi. '*Erkek İnfertilitesinde Eser Elementlerin Roller ve Semen Parametreleri ile İlişkilerinin Değerlendirilmesi.*' Konya, Türkiye.
- Aras, İ. (2009). Tıpta Uzmanlık Tezi. '*Erkek İnfertilitesinde Semen Parametreleri ile Sperm Kromozom Anoploidi Sıklığı İlişkisinin Araştırılması.*' Eskişehir, Türkiye.
- Aslan, E. (2019). Yüksel lisans tezi. '*Sperm hazırlama yöntemlerinin sperm kromatin kondenzasyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi.*' İstanbul, Türkiye.
- Ataman, H. (2007). Yüksek Lisans Tezi. '*Doğal ve infertilite tedavisi sonucu oluşan gebeliklerde psiko-sosyal bakım gereksinimleri.*' İstanbul, Türkiye.

Awadalla, M., Vestal, N., McGinnis, L., & Ahmady, A. (2021). 'Effect of Age and Morphology on Live Birth Rate After Cleavage Stage Embryo Transfer.' *Reprod Sci*, 28(1):43-51.

Aydın Deniz, Ş. (2017). Uzmanlık tezi. 'Erkek infertilitesi nedeniyle yapılan intrastoplazmik sperm enjeksiyonu sikluslarında mikroakışkan çip ile seçilen spermlerin klinik sonuçlara etkisi varmı?' Adana, Türkiye.

Boynukalın, F. K. (2008). Uzmanlık tezi. 'Açıklanamayan İnfertilite Nedeniyle Rekombinant FSH Kullanılarak Kontrollü Ovaryan Hiperstümlasyon ve İntrauterin İnseminasyon Uygulanan Hastalarda Sperm Hyaluranon Bağlanma Testi ile Gebelik Başarısının Öngörülebilirliğinin Araştırılması.' Ankara, Türkiye.

Boyraz, G. (2013). Uzmanlık tezi. 'Açıklanamayan infertilite nedeniyle intrauterin inseminasyonuygulanan hastalarda ejakülattaki preapoptotik sperm oranının intrauterin inseminasyon başarısında etkisinin araştırılması.' Ankara, Türkiye.

Bulgurcuoğlu Kuran, S., & Altun, A. (tarih yok). Derleme. 'Kaliteli spermin seçiminde güncel yöntemler.' İstanbul, Türkiye.

Buran, A. (2015). Yüksek Lisans Tezi. 'Erkek İnfertilitesinde Sperm Kaynağına Göre ICSI İşlemi ile Elde Edilen Embriyoların Embriyo İzleme Yöntemi ile Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi.' İstanbul, Türkiye.

Carlini, T., Paoli, D., Pelloni, M., Faja, F., Dal Lago, A., Lombardo, F., 'Gandini, L. (2017). Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss.' *Reprod Biomed Online*, 34(1):58-65 .

Cho, B. S., Schuster, T. G., Zhu, X., Chang, D., Smith, G. D., & Takayama, S. (2003). 'Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm.' *Analytical Chemistry*, 75(7).

Coşkun, B. (2015). Uzmanlık tezi. '*Klomifen sitrat ile ovulasyon indüksiyonu yapılan açıklanamayan infertilite olgularında anti müllerian hormonun klomifen sitrata yanıtı görmedeki yeri.*' Ankara, Türkiye.

Çapar, M. (1990). Uzmanlık tezi. '*İnfertil kadınlarda Antichlamydial IgG Antikoru araştırılması ve infertilitedeki yeri.*' Konya, Türkiye.

Çetinkaya, S. (2013). Yüksek lisans tezi. '*Oligospermi ve normospermi semen örneklerinde swim up sonrası spermatozoa mitokondriasının mitotracker ile değerlendirilmesi.*' Konya, Türkiye.

Çiçek, M. N., & Mollamahmutoğlu, L. (2009). '*Yardımcı Üreme Teknikleri*' (s. 1-151,283-322). Palme yayıncılık.

Çolgar, U. (2006). '*Reproduktif Endokrinoloji Ve İnfertilite* (s. 1-283).' içinde İstanbul medikal yayıncılık.

Daylan, B. (2021). Yüksek lisans tezi. '*Erkek infertilitesinde reaktif oksijen türevlerine bağlı NOX5'in sperm motilitesi ile ilişkisi.*' İstanbul, Türkiye.

Dinçel, S. (2019, Mayıs). Yüksek lisans tezi. '*Tüp bebek laboratuvar uygulamalarında sperm hazırlama yöntemlerinin IVF başarısı üzerine etkileri.*' Sakarya, Türkiye.

Doğan, Ş. (2008). Yüksek lisans tezi. '*Seminal Plazma Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Sperm DNA Fragmentasyonu ve Apoptozu Sürecinde İnfertiliteye Olan Etkisinin Değerlendirilmesi.*' İzmir, Türkiye.

Durgun Ozan, Y. (2013). Doktora tezi. '*Watson'ın insan bakım kuramına temellendirilmiş hemşirelik bakımının infertilite tedavisi gören*

kadınların,anksiyete,baş etme ve infertilite etkilenme durumlarına etkisi.'
İzmir, Türkiye.

Er, E. (2009). Uzmanlık tezi. '*Erkek infertilitesinde distal ejakülatör kanal patolojileri ve tur-ed tedavi sonuçları.'* Erzurum, Türkiye.

Eroğlu, Z. (2013). Doktora tezi. '*Açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda mevcut periodontal sağlığın infertilizasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi.'*
Ankara, Türkiye.

Fernández-Shaw, S., Cercas, R., Braña, C., Villas, C., & Pons, I. (2015). 'Ongoing and cumulative pregnancy rate after cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer using vitrification for cryopreservation: impact of age on the results.' *J Assist Reprod Genet*, 32(2):177-84.

Gedik Mutlu, E. (2012). 'İnfertilite tedavisinde uygulanan ovulasyon indüksiyonunun gingival inflamasyon ile ilişkisinin incelenmesi' Doktora tezi. Samsun.

Gianaroli, L., Magli, C. M., Ferraretti, A. P., Crippa, A., Lappi, M., Capitani, S., & Bacetti, B. (2008). 'Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection.' *Fertil Steril*, 104-112.

Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Crippa, A., Lappi, M., Capitani, S., & Baccetti, B. (2010). 'Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection.' *Fertil Steril*, Feb;93(3):p. 807-13.

Gil, M., Sar-Shalom, V., Sivira, Y. M., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013). 'Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis.' *Journal of assisted reproduction and genetics*, 479-485.

- Glujovsky, D., Farquhar, C., Quinteiro Retamar, A. M., Alvarez Sedo, C. R., & Blake, D. (2016). 'Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology.' *Cochrane Database Syst Rev.*, 30;(6):CD002118.
- Gode, F., Bodur, T., Güntürkün, F., Gürbüz, A. S., Tamer, B., Pala, İ., & Işık, A. Z. (2019). 'Comparison of microfluid sperm sorting chip and density gradient methods for use in intrauterine insemination cycles.' *Fertil Steril*, 112(5): p. 842-848.
- Güleç Ceylan, G. (2007). Uzmanlık tezi. '*Türk popülasyonunda erkek faktörlü infertilitede Kromozomal anomali ve Y kromozom mikrolelesyonları insidansının belirlenmesi.*' Elazığ, Türkiye.
- Güler, Ç. (2020, Ekim). Yüksek Lisans Tezi. '*Mikroakışkan çip ve gradient yöntemiyle seçilerek ICSI yapılan Asthenoteratozoospermi hasta gruplarında embriyo kalitelerinin karşılaştırılması.*' İstanbul, Türkiye.
- Günalp, S. (2008). '*Üreme endokrinolojisi teknikleri ve cerrahisi.*' İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- İbiş, E. (2020). Doktora tezi. '*İnsan spermelerinde kriyoprezervasyon sonrası paraverin uygulamasının sperm parametreleri ve apoptoz üzerine etkisinin değerlendirilmesi.*' Ankara, Türkiye.
- İlgın, H. (2008). Tıpta uzmanlık tezi. '*Kadınlarda kan ve servikal muküste Çinko, Bakır, Kadmiyum ve Kurşun düzeylerinin infertilite parametreleri üzerine etkisi.*' Eskişehir, Türkiye.
- Işık, S. (2019). Yüksek lisans tezi. '*Swim-up tekniği ile hazırlanacak semen örneklerinde trombosit zengin plazma etkisinin değerlendirilmesi.*' Konya, Türkiye.

Işıkcı, T. (2012). Uzmanlık Tezi. '*Açıklanamayan infertilite olgularında IVF başarısı önceden predikte edilebilir mi?*' Eskişehir, Türkiye.

Kandemir Deniz, Y. (2013). Uzmanlık tezi. '*İnfertilite nedeniyle tetkik edilen endometriozis, açıklanamayan infertilite veya tekrarlayan abortus olgularında çöl yak hastalığı ve otoimmün tiroit hastalığı sıklığının araştırılması.*' Elazığ, Türkiye.

Kara, Ö. (2011). Uzmanlık Tezi. '*Açıklanamayan infertilite nedeniyle kontrollü ovaryan hiperstümlasyon ve intrauterin inseminasyon uygulanan hastalarda İÜİ öncesi sperm hazırlama tekniklerinden swim up ve DGS yöntemlerinin gebelik başarısı üzerine etkilerinin araştırılması.*' Ankara, Türkiye.

Kara, S. (2011). Uzmanlık Tezi. '*İsparta İli'nde İnfertilite Üzerine Epidemiyolojik Değerlendirme.*' İsparta, Türkiye.

Karaca, S. G. (2019). Uzmanlık tezi. '*Açıklanamayan infertilite olgularında vitamin D düzeyleri ve bu düzeylerin ovulasyon indüksiyon parametreleri ile ilişkisi.*' Ankara, Türkiye.

Karakaş, H. E. (2020). Uzmanlık tezi. '*Açıklanamayan infertilite nedeniyle intrauterin inseminasyon(IUI) yapılan hastaların inflamasyon belirteçleri ve gebelik sonuçlarının değerlendirilmesi.*' Ankara, Türkiye.

Kaya, S. (2019, Temmuz). Yüksek Lisans Tezi. '*İdiyopatik Erkek İnfertilitesi ile Seminal Plazma GRP78 Protein Düzeyi Arasındaki İlişkinin Araştırılması.*' Samsun, Türkiye.

Kemik, V. D. (2010). Uzmanlık tezi. '*İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran infertil çiftlerin in vitro fertilizasyon endikasyonları ve gebelik oranları.*' İstanbul, Türkiye.

- Kılıç, N. Ö. (2021). Yüksek lisans tezi. '*Sperm kriyoprezervasyonunun erkek infertilitesinde catsper iyon kanal ekspresyonları üzerine etkilerinin immunofloresan yöntem uygulanarak incelenmesi.*' İstanbul, Türkiye.
- Koç, G. (2013). Doktora tezi. '*Erkek infertilitesinde germ aplazi vakalarında otozomal gen kusurlarının araştırılması.*' İstanbul, Türkiye.
- Koçoğlu, Z. (2020). Yüksek lisans tezi. '*İdiyopatik erkek infertilitesi ile seminal plazma ısı şoku proteini 27 (HSP27) düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması.*' Samsun, Türkiye.
- Konk, D. (2019). Yüksek lisans tezi. '*İn vitro antioksidan uygulamasının sperm fonksiyonları üzerine etkisi.*' İstanbul, Türkiye.
- Kumar, K., Deka, D., Singh, A., Mitra, D., Vanitha, B., & Dada, R. (2012). 'Predictive value of DNA integrity analysis in idiopathic recurrent pregnancy loss following spontaneous conception.' *J Assist Reprod Genet*, 29(9):861-7.
- Külahçioğlu, M. İ. (2012). Tıpta uzmanlık tezi. '*Tubal infertilite açısından risk faktörü olan ve risk faktörü olmayan hastaların histerosalpingografi sonuçlarının değerlendirilmesi.*' Diyarbakır, Türkiye.
- Lara-Cerrillo, S., Ribas-Maynou, J., Rosado-Iglesias, C., Lacruz-Ruiz, T., Benet, J., & García-Peiró, A. (2021). 'Sperm selection during ICSI treatments reduces single- but not double-strand DNA break values compared to the semen sample.' *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(05):p.1187-1196.
- Neyer, A., Zintz, M., Stecher, A., Bach, M., Wirleitner, B., Zech, N. H., & Vanderzwalmen, P. (2015). 'The impact of paternal factors on cleavage stage and blastocyst development analyzed by time-lapse imaging—a retrospective observational study.' *J Assist Reprod Genet.* , 32(11): 1607–1614.

- Neyer, A., Zintz, M., Stecher, A., Bach, M., Wirleitner, B., Zech, N. H., & Vanderzwalmen, P. (2015). 'The impact of paternal factors on cleavage stage and blastocyst development analyzed by time-lapse imaging—a retrospective observational study.' *J Assist Reprod Genet.* , 32(11): 1607–1614.
- Orhon, E. (2008). 'Üreme endokrinolojisi teknikleri ve cerrahisi.' İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Osalou, M. A. (2013). Doktora tezi. 'EIS metodunu kullanarak ICSI ile oositin spermle uygun fertilizasyon zamanının araştırılması.' İzmir, Türkiye.
- Özcan, P., Takmaz, T., Koçer Yazıcı, M. G., Akcın Alagöz, O., Yeşilada, M., Şevket, O., & Fıçıoğlu, C. (2021). 'Does the use of microfluidic sperm sorting for the sperm selection improve in vitro fertilization success rates in male factor infertility?' *J Obstet Gynaecol Res*, 47(1):p.382-388.
- Özkara, G. (2013). Yüksek lisans tezi. 'Septin 12 c.474 G>A polimorfizminin erkek infertilitesindeki rolü.' İstanbul, Türkiye.
- Özkara, G., Alagöz, O., İsmiçoğlu, A., Koçer Yazıcı, M., & Fıçıoğlu, C. (2017). Düşük sperm değerlerine sahip hastalarda Mikroakışkan çip kullanımının Blastokist gelişimine etkisi. *19th World Congress on IVF*, (s. Poster). İstanbul.
- Özkara, G., Alagöz, O., İsmiçoğlu, A., Koçer Yazıcı, M., & Fıçıoğlu, C. (2017). 'Mikroakışkan Çip kullanımının Blastokist gelişimine etkisi.' *19th World Congress on IVF*, (s. poster). İstanbul.
- Özkavukçu, S., & Aras, D. (2017). Derleme. 'IUI ve IVF İçin Sperm Hazırlama Yöntemleri.' Türkiye.
- Quinn, M. M., Jalalian, L., Ribeiro, S., Ona, K., Demirci, U., Cedars, M. I., & Rosen, M. P. (2018). 'Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced

DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples.' *Hum Reprod*, 33.

Ramakrishnan, S., Balasubramanyam, S., Amita, S., & Kumar, P. (2017). 'Sperm separation by Microfluidic Sperm Sorter (MFSS)-Comparison of DNA Fragmentation index, embryo quality, clinical pregnancy rate and implantation rates with density gradient centrifugation.' *Cloud Nine Hospitals, ESHRE'17* Poster.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2017). '*Histoloji konu anlatımı ve atlası*.' Ankara: Palme yayıncılık-6.baskı.

Samuel, R., Feng, H., Jafek, A., Despain, D., Jenkins, T., & Gale, B. (2018). 'Microfluidic—based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility.' *Translational Andrology and Urology*, p.S336-S347.

Sarıkaya, B. (2019). Yüksek lisans tezi. '*Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm DNA fragmentasyonu, sperm kromatin kondensasyonu ve spermin mitokondriyal membran potansiyelinin incelenmesi*.'

Subaşıoğlu, H. (2013). Yüksek lisans tezi. '*Erkek infertilitesinde DEFB126 Delesyon polimorfizmi*.' İstanbul, Türkiye.

Taşkurt Hekim, G. N. (2019, Ekim). Doktora tezi. '*İdiyopatik erkek infertilizesinde DNA fragmentasyonu ile MLH1 ve MSH2 genlerinin promotor metilasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması*.' Samsun, Türkiye.

Taştan, T., Erkaya, N., Abuç, Ö., & Ünal, D. (2020). 'Tüp bebek merkezine başvuran azospermik olgulardan alınan seminifer tübül örneklerinin ultrastrüktürel ve histopatolojik olarak incelenmesi.' *Aksaray üniversitesi tıp bilimleri dergisi*, 1-9.

- Teixeira, D. M., Barbosa, M. A., Ferriani, R. A., Navarro, P. A., 'Raine-Fenning, N., Natri, C. O., & Martins, W. P. (2013). Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction.' *Cochrane Database Syst Rev*, CD010167.
- Tezcan, E. (2017). Yüksek lisans tezi. '*Nedeni açıklanamayan infertilite olgularında sperm DNA bütünlüğünün fertilizasyon başarısı ve erken embriyoner gelişime etkisi.*' Bursa, Türkiye.
- Tüfekçi, M. A., & Başar, M. (2014). Derleme. '*Yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) sperm seçiminde kullanılan teknikler ve yenilikler,*' s. 59.sayı 260-261.
- Uzunlar, Ö. (2019). '*Her yönüyle in vitro fertilizasyon.*' Ankara: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Zekai Tahir Burak kadın sağlığı ve eğitim araştırma hastanesi.
- Veysel Toprak, Özcan Budak, Mehmet Kulhan, Hatice Esra Can, Yasemin İskefiyeli. (2021). 'The Effects Of Different Diet Models On Oocyte Quality, Oocyte Maturation And In Vitro Fertilization Outcomes In Mice.' *The International Institute for Science, Technology and Education*.
- Wang, S., Ding, L., Zhao, X., Zhang, N., Hu, Y., & Sun, H. (2016). 'Embryo Selection for Single Embryo Transfer on Day 3 Based on Combination of Cleavage Patterns and Timing Parameters in in Vitro Fertilization Patients.' *J Reprod Med*, 61(5-6):254-62.
- Wong, K. M., Mastenbroek, S., & Repping, S. (2014). 'Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates.' *Fertil Steril*, 102(1):19-26.
- World Health Organization. (2010). '*WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.*' 5th ed.

- Yagcı, A. (2013). 'İn vitro fertilizasyon ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu için hyaluronik asit'e bağlanma ile sperm seçme tekniği.' *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11 - 18.
- Yalçınkaya Kalyan, E., Can Çelik, S., Okan, Ö., Akdeniz, G., Karabulut, S., & Çalışkan, E. (2019). 'Does a microfluidic chip for sperm sorting have a positive add-on effect on laboratory and clinical outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles?' A sibling oocyte study. *Andrologia*, 51(10).
- Yalçınkaya, S. (2019). Yüksek lisans tezi. 'ICSI kullanılan üremeye yardımcı tedavi(ÜYTE) sikluslarında eş kriptozoospermik/şiddetli oligospermik hastaların normospermik olanlarla gebelik oranlarının karşılaştırılması.' İstanbul, Türkiye.
- Yapça, Ö. E. (2010). Uzmanlık tezi. 'Açıklanamayan infertilite tedavisinde hidrotubasyonun etkinliğinin araştırılması.' Erzurum, Türkiye.
- Yetkinel, S., Kılıçdağ Bulgan, E., Aytaç Çağlar, P., Haydardedeoğlu, B., Şimşek, E., & Cok, T. (2019, Mart). 'Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility: a prospective, randomized controlled trial.' *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, 36(3): p.403-409.
- Yıldırım, M. (2000). 'Klinik İnfertilite.' Ankara: Eryılmaz Ofset.
- Yıldız, K. (2019). Yüksek lisans tezi. 'Tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan hastalarda, alternatif bir yöntem olarak, mikroakışkan sperm ayıklama ciplerinin kullanımı.' Malatya, Türkiye.
- Yılmaz Şahin, T. (2012). Doktora tezi. 'İnfertil çiftlerin infertilite stresiyle başa çıkma yolları.' İstanbul, Türkiye.

Yüksel, Y. (2019). '*Her Yönüyle İn Vitro Fertilizasyon.*' Ankara: Deren Yayıncılık.

Zhao, Y.-Y., You, Y., & Zhang, X.-W. (2018). 'Overall Blastocyst Quality, Trophoctoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer Cycles'. *Chinese Medical Journal*, 131(11).

