



**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU UYGULANAN  
HASTALARDA OOSİT DENUDASYONUNUN FERTİLİZASYON  
VE EMBRİYO KALİTESİ ÜZERİNE PROGNOSTİK DEĞERİ**

**Dr. BERRİN YANGIN DOĞRU  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**SAMSUN - 2021**



**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU UYGULANAN  
HASTALARDA OOSİT DENUDASYONUNUN FERTİLİZASYON  
VE EMBRİYO KALİTESİ ÜZERİNE PROGNOSTİK DEĞERİ**

**Dr. Berrin YANGIN DOĞRU  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Doktor Öğretim Üyesi Aysın Pınar TÜRKMEN**

**SAMSUN - 2021**

## TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji uzmanlık eğitimim esnasında bana her zaman yardımcı olan, yol gösteren, akademik bilgi ve tecrübelerini paylaşan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı, çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimimin, tezimin her aşamasında ve üzerimde inanılmaz emeği olan, her zaman yardımına koşan, bilgi ve deneyimlerini cömertçe benimle paylaşan, desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen, bugüne kadar her zaman yanımda olduğunu hissettiren, bundan sonra da yanımda olacağına emin olduğum, sevgili tez danışmanım, manevi ablam, canım hocam sayın Dr. Öğretim Üyesi Aysın Pınar TÜRKMEN'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Güler yüzü, nezaketi, desteği ve engin bilgisi ile tez çalışmamın istatistiksel analizlerde yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Doç. Dr. Leman TOMAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Merkez Sorumlusu Sayın Hocam Doç. Dr. Davut GÜVEN'e, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Laboratuvar Sorumlusu sayın hocam Prof. Dr. Bülent AYAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince akademik katkılarından dolayı sayın hocam Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER'e, uzmanlık eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan, bilgi, sevgi ve desteklerini esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarı çalışanı Biyolog Mustafa SÖZEN'e yardımları için teşekkür ederim.

Yetişmem, doktor olarak bugünlere gelmemde bana çok büyük emek ve sevgi veren, bu tezi yazarken yaşadığım her sıkıntıda yardım eden, her zaman destek olan, anlayış gösteren çok kıymetli ve değerli, sevgili ailem Melahat YANGIN, Hüseyin YANGIN, Prof. Dr. Gonca YANGIN EKŞİ, Doç. Dr. Ceylan YANGIN ERSANLI, Uzman Dr. Hakan DOĞRU, Prof. Dr. Ercümen ERSANLI, Tonguç Lokman EKŞİ'ye, tüm dostlarıma, sevdiklerime ve tabi ki hayatımın anlamı, yaşama

sevincim, en güzel hediyem, gurur kaynağım, canımın içi, zeytin gzli oğlum mer Kaan DOĞRU'ya sonsuz teşekkür ederim.

*İTHAF*

Bu tezi bana dünyanın en güzel duygusu olan *anneliği* tattıran mis kokulu oğlum *Ömer Kaan'a* ve bu duyguyu tadabilmek için Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran sevgili *anne adayı* hastalarımaya ithaf ediyorum.

## BEYAN

“İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu Uygulanan Hastalarda Oosit Denudasyonunun Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesi Üzerine Prognostik Değeri” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Berrin Yangın Doğru

Tarih:

İmza:

## ÖZET

Bu çalışmada, standartlaştırılmış farklı çap açıklığına sahip plastik pipetler ile yapılan denudasyon işlemi sonrasında oosit etrafında kalan granüloza ve kümülüs hücrelerinin; oosit matürasyonu ve dejenerasyon oranı , fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi, embriyo gelişim oranı, abortus ve canlı doğum oranı üzerine muhtemel etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, açıklanamayan infertilite tanılı 157 kadın hastadan toplanmış 2034 oositden elde edilen veriler retrospektif olarak incelendi. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için, oosit denudasyonlarında kullanılmış pipet çaplarına göre iki grup oluşturuldu. Grup 1: Standart 140µm çaplı pipet ile denudasyonları kısmi yapılmış oosit verilerinden, Grup 2: Standart 135µm çaplı pipet ile denudasyonları tam yapılmış oosit verilerinden oluşacak şekilde sınıflandırıldı. Bu veriler, istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirildi. Pipet çaplarına göre kısmi ve tam denudasyon sonrası, oosit matürasyonu, normal fertilizasyon oranı, erken embriyonal gelişim, transfer sayıları, blastosist sayıları ve morfolojik değerlendirme açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi. Üçüncü gün embriyoları arasında gelişim günü ile uyumsuz blastomer sayısı değişkenleri Grup 2’de Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulundu. Grup 2 oositlerin dejenerasyon oranı ve patolojik nedenlerle gebeliği sonlanan hasta sayıları, Grup 1 ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı yüksek tespit edildi. Grup 1’de canlı doğum oranı, Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

Günümüzde sabit çap açıklığına sahip pipetlerle yapılabilen denudasyon tekniği sonuçları incelenmiş olup, kısmi denudasyon sonrası oosit çevresindeki granüloza ve kümülüs hücrelerinin canlı doğum oranını arttırdığı görüldü. Tam denudasyon sonrası oosit hasarının arttığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Granüloza hücreleri, sperm enjeksiyonu, intrasitoplazmik

## **ABSTRACT**

This study aims to determine possible effects of granulosa and cumulus cells remaining around the oocyte after the denudation procedure with standardized plastic pipettes with different diameters on oocyte maturation and degeneration rate, fertilization rate, embryo quality, embryo development rate, abortion and live birth rate.

In our study, data obtained from 2034 oocytes collected from 157 female patients with unexplained infertility were analyzed retrospectively. Two groups were formed according to the pipette diameters used in oocyte denudations for intracytoplasmic sperm injection. Data was classified as Group 1: Oocytes that were incomplete denuded with a standard 140 $\mu$ m diameter pipette and Group 2: Oocytes that were complete denuded with a standard 135 $\mu$ m diameter pipette. These data were evaluated using statistical methods. There was no statistically significant difference between the groups in terms of pipette diameters after incomplete and complete denudation, oocyte maturation, normal fertilization rate, early embryonal development, transfer numbers, blastocyst counts and morphological evaluation. The number of blastomeres incompatible with the development day among the third day embryos was found to be significantly higher in Group 2 compared to Group 1. The degeneration rate of Group 2 oocytes and the number of patients whose pregnancy was terminated due to pathological reasons were found to be statistically significantly higher when compared to Group 1. The live birth rate in Group 1 was found to be statistically significantly higher when compared to Group 2.

The results of the denudation technique, which can be performed with pipettes with fixed diameter openings today, were examined and it was observed that granulosa and cumulus cells around the oocyte increased the live birth rate after incomplete denudation. It was determined that oocyte damage increased after complete denudation.

**Key Words:** Granulosa cells, sperm injections, intracytoplasmic.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	İ
ÖZET .....	İV
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	İX
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1 İnfertilite.....	3
2.1.1 İnfertilitenin tanımı ve tarihçesi .....	3
2.1.2 İntertilite epidemiyolojisi .....	4
2.1.3 İnfertilite nedenleri .....	4
2.1.4 İnfertilitede tanısal yaklaşım.....	6
2.1.5 İnfertilitede tedavi yaklaşımı ve üremeye yardımcı tedavi yöntemleri .....	16
2.2 Erkek Üreme Sistemi .....	33
2.2.1 Dış genital organlar .....	34
2.2.2 İç genital organlar .....	34
2.3 Kadın Üreme Sistemi .....	45
2.3.1 Dış genital organlar .....	45
2.3.2 İç genital organlar .....	46
2.4 Granüloza ve Kümüllüs Hücreleri.....	63
2.4.1 Granüloza ve kümülüs hücrelerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerine etkisi.....	64
<b>3 GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>74</b>
3.1 Araştırmanın Tasarımı ve Hasta Seçimi.....	74
3.2 Veri Toplanması ve İstatistiksel Analizi .....	76
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>78</b>
4.1. Demografik Bilgiler .....	78
4.2 Grup 1 (SKDG) ve Grup 2 (STDG)'nin istatistiksel karşılaştırılması .....	79
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>89</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>96</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>98</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>127</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>aER</b>	Agranüler Endoplazmik Retikulum
<b>AFC</b>	Antral folikül sayısı
<b>ALPHA</b>	Alpha - Scientists in Reproductive Medicine
<b>AMH</b>	Antimüllerian Hormon
<b>AO</b>	Aritmetik Ortalama
<b>ART</b>	Yardımcı Üreme Teknikleri
<b>ASA</b>	Anti sperm antikor
<b>BMP</b>	Kemik Morfogenetik Proteini
<b>cAMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>CC</b>	Kümüls hücreleri
<b>COC</b>	Kümüls-Oosit Kompleksi
<b>D/C</b>	Dilatasyon ve küretaj
<b>DGS</b>	Dansite-Gradyent Santrifügasyonu
<b>DHT</b>	Dihidrottestesteron
<b>E2</b>	Östradiol
<b>eSET</b>	Elektif Tek Embriyo Transferi
<b>ESHRE</b>	European Society of Human Reproduction and Embryology
<b>ET</b>	Embriyo Transferi
<b>EÜTF</b>	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>FKA (-)</b>	Fetal kardiyak aktivitenin olmaması (negatif)
<b>FSH</b>	Folikül Sitümüle Edici Hormon
<b>G1</b>	Grade 1
<b>G2</b>	Grade 2
<b>G3</b>	Grade 3
<b>G4</b>	Grade 4
<b>GC</b>	Granüloza hücreleri
<b>GDF9</b>	Büyüme-farklılaşma faktörü 9
<b>GDFs</b>	Büyüme-farklılaşma faktörleri
<b>Ger</b>	Granüler Endoplazmik Retikulum
<b>GnRH</b>	Gonadotropin salgılatıcı hormon
<b>GV</b>	Germinal Vezikül
<b>hCG</b>	İnsan Koryonik Gonadotropini
<b>HEPES</b>	Hidroksietil Piperazine Ethane Sulfonik Asit
<b>H&amp;E</b>	Hematoksilen Eozin
<b>HIV</b>	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
<b>HOS</b>	Hipoozmatik şişme testi
<b>HSG</b>	Histerosalpingografi
<b>ICM</b>	İç Hücre Kitlesi
<b>ICSI</b>	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
<b>IUI</b>	İntra Uterin İnseminasyon
<b>IVF</b>	İn Vitro Fertilizasyon
<b>IVM</b>	İn Vitro Matürasyon
<b>KOH</b>	Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon
<b>LH</b>	Luteinizan Hormon
<b>M1</b>	Metafaz 1 immatür oosit

<b>M2</b>	Metafaz 2 matür oosit
<b>Max</b>	Maksimum Değer
<b>MESA</b>	Mikrocerrahi ile Epididimal Sperm Aspirasyonu
<b>MİF</b>	Müllerian İnhibe Edici Faktör
<b>Min</b>	Minimum Değer
<b>MN</b>	Multinükleasyon
<b>NPB</b>	Nükleolar Prekürsör Cisimler
<b>OHSS</b>	Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu
<b>OMI</b>	Oosit Matürasyon İnhibitörü
<b>OPU</b>	Oosite Pick Up (Oosit toplama işlemi)
<b>PAP</b>	Prostatik Asit fosfotaz
<b>PAS</b>	Peryodik Asit-Schiff
<b>PB</b>	Polar Body (Kutup cisimciği)
<b>PCOS</b>	Polikistik Over Sendromu
<b>2PN</b>	İki Pronükleusa Sahip Embriyo
<b>PSA</b>	Prostata Spesifik Antijen
<b>SC</b>	Subkutan
<b>SKD</b>	Standart Kısmi Denudasyon
<b>SKDG</b>	Standart Kısmi Denudasyon Grubu
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>STD</b>	Standart Tam Denudasyon
<b>STDG</b>	Standart Tam Denudasyon Grubu
<b>SUZI</b>	Subzonal İnseminasyon
<b>TDF</b>	Testis Belirleyici Faktör
<b>TESE</b>	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
<b>TNSA</b>	Türkiye Nüfus Verileri Sağlık Araştırması
<b>USG</b>	Ultrasonografi
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa no</b>
<b>Şekil 1.</b> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden invert mikroskop altında çekilmiş fotomikrograf örnekleri (GV, ICM, trofektoderm, 135 ve 140µm çaplı pipetleme sonrası M2 oositler).	20
<b>Şekil 2.</b> Tesarik ve Greco'nun zigot skorlaması sistemi.	26
<b>Şekil 3.</b> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden invert mikroskop altında çekilmiş fotomikrograf örnekleri (ICSI, 2PN, Üçüncü gün grade 1 embriyo).	27
<b>Şekil 4.</b> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden alınmış fotomikrograf örnekleri (COC).	64
<b>Şekil 5.</b> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden invert mikroskop altında çekilmiş fotomikrograf örnekleri (CC, 135 ve 140µm çaplı pipetleme sonrası M2 ve M1 oositler).	74
<b>Şekil 6.</b> Grup 1 ve Grup 2'deki dejenere oositler.	79
<b>Şekil 7.</b> Grup 1 ve Grup 2'deki dejenere oositlerin toplam oositlere oranı.	79
<b>Şekil 8.</b> Blastomer D / Toplam 3. gün embriyo sayısına oranı.	83
<b>Şekil 9.</b> Gruplar arasında biyokimyasal ve klinik gebeliklerin karşılaştırması.	86
<b>Şekil 10.</b> Abortus, ektopik gebelik, fetal kardiyak aktivite yokluğu, anembriyonik gebelik nedenleri ile sonlandırılan gebeliklerin gruplara göre karşılaştırılması ile canlı doğumların gruplara göre karşılaştırılması.	86

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa no</b>
<b>Tablo 1.</b> Grupların demografik ve oosit bilgileri	77
<b>Tablo 2.</b> Gruplara göre oosit morfolojisi	77
<b>Tablo 3.</b> Gruplara göre oosit özellikleri	78
<b>Tablo 4.</b> Grup 1 ve Grup 2'deki fertilizasyon oranları	79
<b>Tablo 5.</b> Grup 1 ve Grup 2'de gelişen embriyo sayıları	80
<b>Tablo 6.</b> İkinci gün embriyolarının gruplar arası karşılaştırılması	81
<b>Tablo 7.</b> Üçüncü gün embriyolarının gruplar arası karşılaştırılması	82
<b>Tablo 8.</b> Yarıklanma dönemi embriyoların değerlendirilmesi	83
<b>Tablo 9.</b> Gruplara göre blastosist evresine ulaşabilen embriyolar	84
<b>Tablo 10.</b> SKDG ve STDG'de günlerine göre transfer edilen embriyolar	84
<b>Tablo 11.</b> Gruplara göre erken embriyonal dönem embriyo gelişim oranları	85
<b>Tablo 12.</b> Gruplarda embriyo transfer oranları	85
<b>Tablo 13.</b> Gebelik durumu ve gebelik kaybı	86
<b>Tablo 14.</b> Gruplara göre taze embriyo transferi	87

## 1 GİRİŞ VE AMAÇ

Çocuk sahibi olma beklentisi olan çiftlerin 12 ay süreli düzenli ve korunmasız cinsel ilişki sonrası gebe kalamaması infertilite adı verilen sağlık sorunu olarak adlandırılır. Bu süre sonunda çiftlerin %15'i infertildir (1-3). Tanısal olarak değerlendirilme endikasyonları vardır. Doğurganlığın yaş ilerledikçe azalması nedeniyle, 35 yaş üstü kadınların 6 ay gebe kalma çabasının başarısız olması tanısal olarak erken değerlendirme gerektirir. İnfertilite nedenlerinin tespit yöntemleri sistematik, hızlı ve uygun maliyete yapılmalıdır (1-3).

Erkek infertilitesinde; pretestiküler, testiküler, posttestiküler nedenler sorgulanırken kadın infertilitesi; ovulasyon, over rezervleri, fallopian tüpler, uterus ve serviks yönünden tanısal olarak değerlendirilir (4-5). İnfertilite tedavi seçenekleri arasında tıbbi gelişmelere paralel olarak bir çok yardımcı üreme tekniği yer alır. Bu teknikler arasında bulunan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), invert mikroskop altında bir mikromaniplator yardımıyla sağlıklı ve aktif spermin seçilerek oosit sitoplazması içine enjekte edilmesi yöntemidir (6). Konvansiyonel in vitro fertilizasyonda (IVF) ve ICSI' de kontrollü ovaryan hipersitimülasyon (KOH) protokolleri sonrası döllenme vücut dışında embriyoloji laboratuvar ortamında gerçekleştirilir. Over indüksiyonu sonrası insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulamasından yaklaşık 34-36 saat sonra oosit toplama işlemi (OPU) yapılır (7). Konvansiyonel IVF ve ICSI'de oositlerin toplanması ve kümülüs-oosit kompleksinin (COC) sınıflaması benzerlik gösterebilir, ICSI işlemi için oosit hazırlığı farklılık gösterir. ICSI uygulanacak tedavi döngülerinde, oositler OPU'dan 60 veya 180 dakika sonra hyaluronidaz içeren HEPES-tamponlu ortam ile muamele edilir. Kümülüs ve korona hücrelerinin uzaklaştırılması (denudasyon), hyaluronidaz ile bağlantı komplekslerinin zayıflatılması sonucu cam veya plastik mikropipetler aracılığı ile yapılır. Pipetlerin çaplarına göre oosit çevresindeki rezidüel hücrelerin miktarı ve işlem süresi farklılık gösterir. Al-ver sonrası oositler yalnız medyum içeren droplarda durulanır. Nükleer matürasyon yönünden invert mikroskop altında değerlendirilen oositler içinde, birinci polar cisimciğini ekstrüde eden metafaz 2 aşamasında olanlar ICSI işlemi için kabul edilir (8-10).

Kümülüs ve granüloza hücreleri ideal spermi seçmebilme, oosit gelişimi ve matürasyonunu düzenleyebilme, embriyo kalitesi ve implantasyon başarısını artırabilme yeteneğine sahiptir (11, 14). Oositin kümülüs hücreleri ile birlikte kültüre edilmesinin embriyo kalitesini iyileştirdiği ve blastosist gelişme oranlarını arttırdığı görülür (15, 16). ICSI yöntemi yüksek fertilizasyon başarısına sahip bir yardımcı üreme tekniğidir (17).

ICSI'de konvansiyonel IVF'e göre daha yüksek oranda fertilizasyon tespit edilirken, konvansiyonel IVF'de ICSI'ye göre daha yüksek oranda ve kalitede blastosist gelişim oranları tespit edilmiştir. Erkek faktörüne bağlı infertilitede ICSI, fertilizasyon başarısı açısından üstünlük sağlamakla birlikte, erkek infertilitesi dışlandığında konvansiyonel IVF'de implantasyon ve gebelik oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (18-22).

Literatürde ICSI uygulanacak oositlerin, denudasyon sonrası kalan granüloza ve kümülüs hücrelerinin etkileri incelenmiş olsa da, el ile çekilen cam pipetler kullanılmıştır. Çap açıklığı gözlemsel olarak nitelikli sabitlenemediğinden hem oosit hasarına yönelik hem de granüloza hücre miktarına yönelik standardizasyon yapılamamıştır. Denudasyon sonrası gruplardan, karma transfer yapılmış olması nedeniyle implantasyon ve gebelik objektif değerlendirilememiştir (14).

Yaptığımız retrospektif çalışmada; plastik pipetler ile yapılmış denudasyon sonucunda oosit etrafında rezidüel granüloza ve kümülüs hücrelerinin; oosit matürasyonu, fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi, embriyo gelişim oranı ve canlı doğum üzerine etkileri olduğunu düşünmekteyiz. Standart çap açıklığı sonucu sabit miktarda granüloza ve kümülüs hücrelerinin yukarıda belirtilen parametreler üzerine muhtemel etkileri ile pipet çapına spesifik oosit hasar oranlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesini amaçlamaktayız.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 İnfertilite

#### 2.1.1 İnfertilitenin tanımı ve tarihçesi

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) infertiliteyi bir yıl korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamama olarak tanımlamıştır (23). Eski çağlarda üremenin sadece kadına bağlı olduğuna inanılmıştır. Bir çok mitolojik figürde kadın üreme ve bereket sembolü olarak tasvir edilmiştir (24). Antonii van Leeuwenhoek 17. yy'da ilk mikroskobu keşfederek spermi tanımlamış ve erkek üremesindeki rolünü ortaya çıkarmıştır (24-26).

WHO göre 'Sağlık sadece hastalık ve sakatlığın olmayışı değil, bedence, ruhça, mental ve sosyal açıdan tam bir iyilik halidir (27)'. İnfertilite ciddi depresyon, içe kapanma, öfke, anksiyete, maddi kayıp, sosyal statü kaybı ve cinsel fonksiyon bozuklukları gibi etkilere yol açar (28-36). İnfertilite bu olumsuz etkileri nedeniyle ciddi bir sağlık problemidir. Son yıllarda tıp alanında yaşanan büyük gelişmeler sayesinde infertilite nedenleri daha iyi aydınlatılarak yeni üremeye yardımcı tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (37-43).

*İnfertilite tedavilerinin yarım yüzyıllık tarihçesi :*

İnfertilite her çağda insanlık için sorun oluşturmuştur. Yapılan araştırmalar nedene yönelik tedavilerin keşfedilmesi ile bu soruna ışık tutmuştur.

Cushing ve arkadaşları 1909 yılında köpeklerde hipofiz bezi ablasyonu sonucu genital organlarda atrofi geliştiğini gösterdiler. Böylece hipofizin üreme sistemimdeki rolü fark edildi (24). İlk defa 1925'de gebe kısırakların serumundan elde edilen gonadotropin, deneysel çalışmalarda, 10 yıl sonra ise klinikte kullanılmaya başlandı. İnsan menapozal gonadotropini (hMG) ve hCG birlikte kullanılarak ilk başarılı gebelik 1961'de gerçekleşmiştir. Bu alanda ilk ilaç olan klomifen sitrat 1956'da sentezlendi ve 1967 yılında Food and Drug Administration (FDA) onayını aldı. 1971 yılında Schally ve arkadaşları hipotalamustan salgılanan ve hipofizi etkileyen Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)'u keşfetti. Yapılan hayvan deneylerinde

gebeliğin devamı açısından korpus luteumun önemli olduğu tespit edildi. İlk sentetik progesteron 1934 yılında sentezlendi (44,45).

İnfertilite için tedavi arayışlarında John Hunter ve J. Marion Sims'in suni döllemeyi uygulması yol gösterici olmuştur (46). İlk embriyo transferi 1891 yılında tavşan üzerinde yapılmıştır (47, 48). İlk in vitro fertilizasyon, ameliyat olan kadınların oositleri kullanılarak 1948 de gerçekleştirilmiştir (49). Robert Edwards'a Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülünü kazandıran buluş, infertil bir anneden Louise Brawn isimli ilk tüp bebeğin dünyaya gelmesidir (50). Günümüze kadar yardımcı üreme teknikleri (ART) sayesinde beş milyondan fazla bebek doğmuştur (46). Türkiye'de ilk Tüp Bebek Merkezi 1988 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinde (EÜTF) kuruldu. EÜTF'de 1995-1998 yılları arasında ilk İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI), Mikrocerrahi yöntemi ile Epididimal Sperm Aspirasyonu (MESA), Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) ve dondurulmuş embriyo transferi gerçekleştirildi (24). Ülkemizde toplam 32 ilde, 148 IVF merkezi aktif faaliyet göstermektedir (51).

### **2.1.2 İntertilite epidemiyolojisi**

Dünyada infertiliteden etkilenen insan oranı % 8-12 arasındadır (52). Türkiye Nüfus Verileri Sağlık Araştırması (TNSA) 2018 sonuçlarına göre 15-49 yaş aralığında evli kadınların % 4'ünün hiç canlı doğumu yoktur. Üreme çağında hiç çocuğu olmayan kadın sayısı dolaylı olarak primer infertilite oranınının göstergesi olarak kullanılabilir. Erkek infertilitesi ve sekonder infertilitenin de dahil edilmesi ile bu oran daha da artarmaktadır (53).

### **2.1.3 İnfertilite nedenleri**

İnfertilitenin % 40-50'sinde primer kadın faktörü, % 20-30'unda primer erkek faktörü, % 20-30'unda ise her ikisi birlikte etkilidir. Ancak bireylerin % 10-15'inde infertilite nedeni açıklanamamaktadır (54).

Gebelik oluşabilmesi için sağlıklı kadın ve erkeğin genital muayene bulgularının normal olması ve bir araya gelen üreme hücrelerinin anne rahmine yapışma

potansiyeline sahip olması gerekir. Çiftlerde hormonal, anatomik ve fizyolojik problemler infertiliteyle sonuçlanmaktadır (55).

***Erkek infertilitesi nedenleri:***

Erkek infertilitesi primer veya sekonder kaynaklı olabilir.

Konjenital infertilite nedenleri arasında; hipospadias, genital kanal obstrüksiyonları ve agenezisi, bilateral testiküler atrofi, genital anomaliler, Kartagener Sendromu, 5- $\alpha$  redüktaz eksikliği, Y kromozomu mikrolelesyonu, Reifenstein Sendromu, Kallmann Sendromu gibi hastalıklar sayılabilir (56-62).

Kazanılmış infertilite nedenleri arasında; Diyabetes Mellitüs, troid bozuklukları, sekonder testiküler yetmezlik, yüksek prolaktin düzeyi, obezite, enfeksiyöz nedenler, immünolojik nedenler, nörolojik hastalıklar, sistemik hastalıklar kriptorşidizm, medulla sipinalis hasarı, parapleji, varikosel, tetis tümörü, lösemi ve lenfoma gibi magliteler, spermatogenik matürasyon arresti, ağır egzersiz ve anabolik steroid kullanımı, yoğun stres, testis torsiyonu, impotans ve seksüel problemler gibi hastalıklar yer alır (56, 60, 63-77).

***Kadın infertilitesi nedenleri:***

***Ovulasyon bozuklukları (Anovulasyon):***

Menstrual siklusun sorgulanması, ovulasyon ve folikül gelişimi hakkında bilgi verir. Bulgular; amenore, düzensiz menstrual siklus ve hirsütizimdir. Anovulasyon % 30-40 oranında görülür (54).

Hipogonadotropik-hipogonadizm grubundaki bulgular: Folikül sitümüle edici hormon (FSH) <5 mIU/ml, Luteinizan hormon (LH) <5 mIU/ml, östradiol (E2) <40 pg/ml, ultrasonografide (USG) endometriyal kalınlık (EK) <5 mm'dir. Nedenleri arasında; idiopatik (en sık neden), aşırı stres, ağır egzersiz, anoreksiya nevroza, ağır malnütrisyon, ani kilo kaybı yer alır (54).

Hipergonadotropik-hipogonadizm grubundaki bulgular: FSH >20 µIU/ml, LH >20 µIU/ml, E2 <40 pg/ml'dir. Nedenleri; prematür over yetmezliği, over tümörleri, Rezistan Over Sendromudur (54).

Normogonadotropik-hipogonadizm grubundaki bulgular: FSH ve LH normaldir. Nedenleri; Polikistik Over Sendromu (PCOS), obezite, adrenal bozukluklar, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları ve over yetmezliğidir (genetik, otoimmün ve kemoterapi tedavisine sekonder nedenlerle over foliküllerinin azalması) (54, 78, 79).

Hiperprolaktinematik grup: Prolaktin hipofizin laktotrop hücrelerince salgılanan ve laktasyon, metabolizma, davranış, su-tuz dengesi ve immünregülasyondan sorumlu bir hormondur. Yaşa, menstrual siklusa, günün değişen saatlerine ve strese göre salınımı değişkenlik gösterir. Sabah aç 30 dakika ara ile alınan iki kan örneği sonucunun ortalaması ile değerlendirilir. Klinikte hastalarda anovulasyon, amenore, infertilite ve galaktore görülebilir. Nedenleri; fizyolojik (Gebelik, postpartum dönem) ya da patolojik (prolaktinoma, Empty Sella Sendromu, akromegali, kraniyofaringioma, meningioma, hipofiz adenomları, sarkoidoz, kronik böbrek yetmezliği, siroz, adrenal yetmezlik, hipotiroidi) olabilir (54, 80).

#### *Pelvik faktörler:*

Asherman Sendromu, pelvik inflamatuvar hastalık, genital tüberküloz gibi enfeksiyöz nedenler, endometriozis, servikal nedenler, myom, polip, konjenital yapısal anomaliler, Antifosfolipid Antikor Sendromu, Lupus gibi immünolojik nedenler, hipotiroidi, Diyabetes Mellitus, renal yetmezlik gibi kronik hastalıklar, ağır egzersiz, anoreksiya nervoza gibi yeme bozuklukları, obezite ve iyatrojenik nedenlere bağlı olarak kadınlarda infertilite görülebilir (54, 81-91).

### **2.1.4 İnfertilitede tanısal yaklaşım**

#### **İnfertil çiftin değerlendirilmesi:**

Son kırk yılda infertilite tanı ve tedavi yöntemlerinde büyük ilerlemeler gerçekleşti. Bu daha önce tedavisi olmadığı düşünülen infertil hastalar için yeni bir

gelişmeydi ve hastaneye başvuran infertil hasta sayısının artmasına sebep oldu. İnfertilite nedeninin tespiti, uygun tedavinin planlanabilmesi için gereklidir. Bu nedenle infertil hastalar, ayrıntılı anamnez, testler ve fizik muayene ile değerlendirilir (92).

**Anamnez:** Çiftin evlilik süresi, korunmasız cinsel ilişki süresi, daha önce kullandıkları doğum kontrol yöntemleri, gebelik, canlı doğum ve abortus özgeçmişi, menarş yaşı, menstrual siklus bilgisi, koitus sıklığı ve zamanlaması, geçirilmiş ateşli hastalıklar ve cerrahiler, sistemik hatalıklar, ilaç, sigara, alkol kullanımı, meslekleri, genetik hastalık öyküsü, cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü gibi bilgiler eksiksiz sorgulanmalıdır (92).

TNSA 2018 verilerine göre 15-49 yaş arası kadınların gebe kalınabilecek döneme ait bilgileri değerlendirilmiş, sadece dörtte birinin gebe kalınabilecek dönemi doğru bildikleri görülmüştür (53). Menstrual siklusun yanlış günlerinde cinsel ilişkiye girilmesi, yanlış cinsel ilişki sıklığı gibi bilgi eksiklikleri veya vajinal duş gibi yanlış uygulamalar varsa ayrıntılı bir anamnezle tespit edilebilir. İdeal cinsel ilişki sıklığı gün aşırıdır. Daha sık ya da daha seyrek cinsel ilişki gebelik şansını azaltmaktadır. Sadece bu yanlış uygulamaların tespiti ve düzeltilmesi ile gebelik mümkün olabilir (93, 94).

**Fizik muayene:** Erkek hastanın önce genel muayenesi yapılmalı, fenotipi değerlendirilmeli, jinekomasti, erkek tipi kıllanması ve vücut yapısı yönünden incelenmelidir. Aynı şekilde kadın hastanın da önce fenotipi, vücut yapısı, gelişimi, obezite, hirsütizm, akne varlığı, tiroid bezi değerlendirilmelidir. Daha sonra her iki cinsiyetin de dış genital organları incelenmelidir. Erkek hastanın penis ve prostat yapısı, cilt lezyonu, üretral açıklığın yeri, akıntı olup olmadığı, testis büyüklüğü, ele gelen kitle varlığı ve skrotum içinde olup olmadığı, varikosel, vaz deferensin, epididimisin olup olmadığı, kasık fitiği varlığı mutlaka değerlendirilmelidir. Kadın hastanın dış genital organları, adneksiyal kitle varlığı mutlaka değerlendirilmelidir. Ayrıca pelvik muayenenin ağırlı olup olmadığı, vajinal akıntı, genital lezyonlar ve galaktore araştırılmalıdır (54).

**İnfertilite temel testleri:** Spermiyogram, ovulasyon tespit testleri, post koital test (PCT), rahim ve tüplerin anatomisinin incelenmesi ve laparoskopi'den oluşmaktadır (95).

**Erkek infertilitesinde kullanılan laboratuvar testleri:**

**a. Semen analizi (Spermiyogram):**

Kadınları infertilite açısından değerlendiren testler siklusun belirli günlerinde yapılabilir. Daha pahalı ve invazivdirler. Bu nedenle erkek infertilite faktörünün dışlanması için ilk olarak spermiyogram yapılmalıdır. Spermiyogram sonuçlarının referans aralıkta tespit edilmemesi durumunda testin tekrarı ve üroloji uzmanı konsültasyonu gereklidir (92).

Örnek almadan önce hasta yapması gerekenler hakkında sözlü ve yazılı olarak bilgilendirilmelidir. Cinsel perhis süresi 2-3 gün olmalıdır. Hasta idrarını yaptıktan sonra ellerini ve penisini su ve sabunla yıkamalıdır. Örnek androloji laboratuvarına bitişik özel bir odada mastürbasyon yolu ile alınmalıdır. Kayganlaştırıcı veya prezerfatif kullanılmamalıdır. Örnek hızlıca laboratuvara teslim edilmelidir. Kişiden verdiği örneğin kendisine ait olduğunu beyan ettiği, üzerinde tarih ve saat yazılı imzalı bir belge alınmalıdır. Örnek kabının üzerine ve kapağına ad, soyad, tarih, saat, cinsel perhis süresi, numunenin eksiksiz alınıp alınmadığı bilgisi yazılmalıdır. Eğer numune eksikse ikinci bir örnek alınabilir. Numune oda sıcaklığında bekletilmeden 37°C inkübatöre yerleştirilmelidir. Örnek semen hacimi, sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve morfolojisi yönünden üç saat içinde ilgili kişi tarafından değerlendirilmelidir (96).

**Semen değerlerine göre terimler:**

Normozoospermi: Referans değerler içinde normal sperm konsantrasyonu ve ejakülat,

Oligozoospermi: Referans değerlerden daha düşük sperm konsantrasyonu,

Asthenozoospermi: Referans değerlerden daha az motiliteye sahip spermler,

Teratozoospermi: Referans değerlerden daha düşük normal morfolojili spermiler,  
Oligoasthenoteratozoospermi (OAT): Üç parametrede referans değerlere göre bozulmuştur,

Azoospermi: Ejekülatta hiç spermin bulunmaması,

Aspermi: Ejekülatın hiç olmaması,

Kriptoospermi: Ejekülatın ilk değerlendirilmesinde hiç sperm yokken, santrifüj sonrası birkaç tane spermin görülmesi,

Polizoospermi: Ejekülatta çok yüksek sperm konsantrasyonu (> 250 milyon /ml) olması durumudur (56, 63).

WHO klavuzununun 2010 yılı referans değerlerine göre belirlenen alt referans değerler şöyledir: Semen hacmi (1.5ml), Sperm konsantrasyonu (15 milyon / ml), Total sperm sayısı (39 milyon/ejekülat), Total motilite (% 40), Progresif motilite (% 32), Vitalite (% 58), Normal morfoloji (% 4), pH  $\geq$  7.2 ve Lökosit (< 0.1milyon / ml) (96,97).

### **Semen değerlendirilmesi:**

*Görünüm:* Semen homojen, beyazımtıraktır. Sperm miktarı arttıkça rengi opaklaşır. Enfeksiyon ve pyospermi varlığında sarımtırak, eritrosit varlığında kırmızı-kahverengi görülür.

*Likefaksiyon:* Oda sıcaklığında normal şartlarda 30 dakika içerisinde likefiye olması beklenir. Likefaksiyon prostat bezinin salgıları ile gerçekleşir. Bu sürenin bir saati geçmesi durumuna likefaksiyon defekti adı verilir. Pipetle al-ver yapılarak likefaksiyon süresi kısaltılabilir. Numunede tek kullanımlık plastik pipetle hava kabarcığı oluşturmamaya özen göstererek al-ver yapılır. Likefaksiyon pipetin ucundan numune damlatılarak değerlendirilir. Numunenin pipetten damlaması likefiye olduğu anlamına gelir. Semen erkek ürogenital kanallarında akışkandır. Semen dış ortamda koagüle olarak akışkanlığını kaybetmesini seminal vezikül salgıları sağlar. Koagülasyon defektinde seminal vezikül patolojisi veya vas deferens agenizinden şüphelenilir (96).

*Volüm:* 1.5-7 ml arasısemen hacmi WHO'a göre normal kabul edilir. Ejkülat, sperm ve bezlerin salgılarından oluşur. (Prostat bezi salgıları % 15-20, seminal vezikül salgıları % 70-80, epididimis salgıları % 5-10, üretral gland salgıları % 3-5'ini oluşturur.)

*pH:* 7.2-7.8 arasında olması normal kabul edilir. Örnek alındıktan yarım saat sonra ölçülmelidir.

*Mikroskopik inceleme:* Örnek faz kontrast mikroskop altında 100X büyütmede incelenir. Sperm aglütasyonu, sperm dışı yapılar ve hücreler (İmmatür spermler olan yuvarlak hücreler, dökülmüş epitel hücreleri ve lökositler) değerlendirilir. Daha sonra örnek sırası ile 200X ve 400X büyütmede incelenir. Semen çok lökosit içermesi durumuna piyospermi adı verilir. Bu durum enfeksiyon olabileceğini düşündürür. Lökositlerin semende varlığı sperm motilitesine zarar verebilir.

*Sperm agregasyonu:* Spermler artık madde ve hücre yığınlarına yapışarak kümeler oluşturur.

*Spermlerin aglütinasyonu:* Spermlerin baş ya da kuyruklarından birbirlerine yapışarak kümeler oluşturmasıdır. Yapışma sıkıysa spermler hareketsiz kalabilir. Aglütinasyon dört derece (grade)'dir: 1. Grade (Hafif): <10 sperm birbirine yapışmıştır. 2. Grade (Orta): 10-50 arası sperm birbirine yapışmıştır. 3. Grade (Geniş): >50 sperm birbirine yapışmış ve az sperm serbesttir. 4. Grade (Yoğun): Spermlerin tümü aglütine olmuştur.

*Sperm sayımı:* Makler gibi özel sperm sayım kameraları kullanılır. Bir damla semen Makler kamerasına konulur ve kapağı kapatılarak faz kontrast mikroskop ile incelenir. Makler kamerasının 100 karesinin yatay ya da dikey 10 karesinde bulunan tüm spermler sayılır. Bu sayıma tüm sperm başları, motil, inmotil ve tüm spermler dahil edilir. Elde edilen değer milyon/ml'deki sperm sayısını verir (96, 97).

*Toplam sperm sayısı:* Sperm konsantrasyonu x Semen hacmi formülü ile tespit edilir.

*Sperm hareketliliği:* Alanda en az 200 sperm sayılarak değerlendirilmelidir. Örnek alındıktan iki saat sonra bile spermlerin yarısı hareketli olmalıdır. Hareketlilik üç şekildesınıflandırılabilir: Progresif motilite: İleriye doğru hareket eden spermlerdir. İki gruba ayrılır. Hızlı progresif motilite ve yavaş progresif motilite. Nonprogresif motilite: Yerinde sallanan spermlerdir. İmmotilite: Hiç hareket etmeyen spermlerdir (96, 97).

*Sperm canlılığı:* Hareketsiz spermler ve ölü spermlerin ayrımı önemlidir. Vitalite iki boyama (Eozin-nigrozin/Eozin) ve Hipoozmatik Şişme testi (HOS) ile değerlendirilir. Ölü hücrelerin plazma membranlarında membran bütünlüğü bozulduğu için boya geçerek hücre sitoplazmasını pembe renge boyar ve canlı-ölü ayrımı yapılabilir. HOS ise canlı hücreler hipotonik ortamda membran bütünlüğünden dolayı şişerler. Boyama yapılan spermler tedavi amaçlı tekrar kullanılamazken HOS yapılan spermler ise kullanılabilir (97).

*Sperm morfolojisi:* İlk olarak 1930'lu yıllarda sperm morfolojisi ile ilgilenilmeye başlanılmıştır. Morfoloji de en az sperm sayısı ve konsantrasyonu kadar önemlidir. Bir numunede en az 200 sperm 1000X büyütmede immersiyon yağı ile değerlendirilir. Sperm morfolojisi değerlendirilirken Kruger kriterleri kullanılır (98). Baş, boyun, orta ve kuyruk kısmı incelenir. Baş 4.0-5.0 x 2.5-3.5 x 1.5-1.75µm boyutlarında oval şekilli ve vakuolsüz olmalıdır. Akrozom başın % 40-70'ini kaplamalıdır. Orta kısım akrozomun ters ucunda yer almalı ve eni 1µm, boyu ise ortalama 7-8µm olmalıdır. Kuyruk ortalama 45µm uzunlukta düz ve ince olmalıdır (56). Morfolojinin % 5-14 olması normal kabul edilirken, % 4'ün altında olması ise kötü prognoz nedenidir (99, 100).

**b. Endokrin testler:** Cinsel fonksiyon bozukluğuna sahip ve düşük sperm sayısı olan hastalarda hormonal değerlendirilme yapılabilir.

- FSH: Kanda yükselmesi spermatogenez problemini gösterir.
- Testesteron: Serbest ve total testesteron hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı değerlendirmemize olanak sağlar. Düşük değerler aks problemini gösterir.
- İnhibin B: FSH ile birlikte spermatogenezini değerlendirmemize olanak tanır.

- Prolaktin: Cinsel fonksiyon bozukluğu olan hastalarda değerlendirilmelidir.
- LH: Düşük testesterona sahip hastalarda değerlendirilmelidir.
- Östrojen: Jinekomastisi olan hastalarda değerlendirilmelidir.

**c. Postkoital test (Sims-Huhne Testi):** Sperm ve servikal mukusun birbirleriyle etkileşimini gösterir.

**d. İdrar testi:** Enfeksiyon varlığı ve retrograd ejakülasyon tanısı koymak amacı ile ejakülasyon sonrası alınan idrar örneğinde değerlendirilir (101).

**e. Görüntüleme:**

- Transrektal ultrasonografi (TRUS): Prostat bezi, vezikulo seminalis ve ejakülatuar kanallar değerlendirilir.
- Skrotal ultrasonografi: Testis değerlendirilir.
- Dopler ultrasonografi: Varikozel değerlendirilir.
- Venografi: Varikozel tanısında kullanılan invaziv bir yöntemdir.
- Vazografi: Duktus deferens obstrüksiyonu değerlendirilir.
- Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans (MGR): Kitle ve malignite varlığı ve inmemiş testis araştırılır (102).

**f. Genetik inceleme:** Obstrüktif olmayan şiddetli oligospermi durumunda yapılmalıdır (101).

**g. Testis biyopsisi:** Tanı ve tedavi amaçlı yapılır. Bir çok alandan örnek alınarak testisin tamamı değerlendirilir. Bu amaçla ince iğne aspirasyon biyopsileri ve tru-cut biyopsiler yapılır. Örnek, formaldehit yerine spermatogenik hücrelere zarar vermeyen Bouin solüsyonuna konularak, rutin doku takibi yapılır. Numune hematoksilin eozin (H&E) ve periodik asit-schiff (PAS) ile boyanarak histopatolojik değerlendirme yapılır. Örnekte sperm çıkması durumunda daha sonra kullanılmak üzere dondurulması uygundur (103).

**h. Antisperm antikor (ASA) ölçümü:** Serum, seminal sıvı ve servikal mukusta bakılabilir. Kan testis bariyerinin bozulduğu çeşitli patolojik durumlarda görülür. ASA pozitif olması durumunda spermın oositi fertilize etme yeteneği azalır. Özellikle açıklanamayan infertilite grubunda ASA pozitifliği anlamlıdır (101).

**i. İleri testler:** Spermın zona pellusidaya penetrasyon testleri, Sperm DNA hasarı testleri ve bilgisayar yardımlı sperm analizi (CASA) testleri gibi yeni yöntemlerdir (104).

Zaman içinde sperm sayısı, semen volümü ve sperm hareketliliğinin de azaldığı görülür (105). 1938-1990 yılları arasında yapılan 61 çalışmanın verilerinin incelendiği bir derlemede mililitrede sperm sayısının 113 milyondan 66 milyona düştüğü ve semen volümünün ise 3.4 ml'den 2.75 ml'ye düştüğü gösterilmiştir (106).

1976-2009 yılları arasında 1114 sperm donörlerinin semen örneklerinin incelendiği bir başka çalışmada ise sperm sayısının mililitrede 443.2 milyondan 300.2 milyona düştüğü, hareketliliğinin % 64'den % 49'a düştüğü, vitalitesinin % 88'den % 80'e düştüğü ve normal morfolojiye sahip sperm yüzdesinin % 67'den % 28'e düştüğü gösterilmiştir (107). Tabi ki sperm kalitesini ırk ve coğrafi farklılıkların etkilediği görülmektedir. Sanayileşmiş toplumlarda daha çok sperm sayısında azalma görülürken, az gelişmiş kırsal bölgelerde ise görülmez. Sperm kalitesi, küresel ısınma, elektromanyetik alan maruziyeti, gıda koruyucu madde kullanımı, çevresel toksik madde maruziyeti, hava kirliliği, yoğun stress, ırk ve coğrafi farklılıklardan etkilenir (108). Zaman içinde ART ihtiyacı artabilir (105, 109).

## **Kadın infertilite testleri**

### **a. Over rezervini gösteren testler:**

Günümüzde çocuk doğurma yaşının çeşitli sebeplerle gecikmesine bağlı olarak infertilite oranları artmıştır. Bu durum over rezerv testlerini önemli hale getirmiştir. Yaşlanma ile birlikte folikül, oosit sayısı azalır ve oosit kalitesi düşer. Folikül yeterli sayıda iken granüloza hücrelerinden salgılanan E2 ve inhibin B FSH'ı normal aralıkta tutar. Folikül hücreleri azalınca E2 ve inhibin B azalırken, buna

bağlı olarak FSH artar. Folikül sayısının yaşla birlikte azalmasından ötürü anöploidi artışı, zamanla oositte biriken serbest oksijen radikalleri etkisi ile birlikte oositin çevresinde bulunan bozulmuş granüloza hücreleri bu durumdan sorumlu tutulur. Bu testler düşük maliyetli, non-invaziv ve kolay uygulanır olmaları nedeniyle rutin kullanılırlar (110, 111).

- Bazal serum FSH değeri: Menstrual siklusun 3. gününde alınan kanda bakılan FSH >10 mIU/ml ve bazal serum E2 değeri; menstrual siklusun 3. gününde alınan kanda bakılan E2 <80 pg/ml olması iyi bir over rezervi olduğunu gösterir (110, 111).

- Bazal inhibin B testi: İnhibin B folikülogenez esnasında granüloza hücrelerinden salgılanır. Over rezervi azaldığında doğal olarak folikül sayısı ve inhibin B'de azalır. FSH üstündeki negatif feedback etkisi ile folikül gelişimini uyarır. Ölçülen değerinin >45 pg/ml olması iyi bir over rezervi göstergesidir (110, 111).

- Antimüllerian Hormon (AMH): Siklusun herhangi bir gününde ölçülebilmesi avantaj sağlar. AMH, folikülogenezde görev alan nondominant küçük çaplı folikül granüloza hücrelerinden salgılanır. AMH değeri, puberte ile birlikte yükselerek reproduktif dönemde en yüksek seviyeye ulaşır ve menapoza yaklaştıkça hızla azalır. 0.5-1.26 ng/ml arası AMH değeri birkaç yıl sonra menapoza girileceğinin göstergesidir. <1ng/ml'den düşük değerler kötü over rezervini gösterir. Ayrıca yüksek AMH değerleri ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) adı verilen hayati tehlike yaratabilecek ciddi bir durumun göstergesi olabilir (110).

- Antral folikül sayısı (AFC): Stimülasyon sonrası USG ile overdeki foliküller sayılır. <10 folikül kötü over rezervini göstergesidir. AFC, AMH gibi hem over rezervini hem de OHSS olasılığının göstergesidir.

- Dinamik testler (Klomifen Sitrat Challenge Test - CCCT): Menstrual siklusun 3. gününde alınan kanda ki FSH değeri ölçülür. Siklusun 5.-9. günlerinde 100 mg/gün dozda klomifen sitrat verilir. Daha sonra tekrar FSH düzeyine bakılarak düşüş olup olmadığı değerlendirilir. Over rezervi iyi ise FSH düşmektedir (110).

- Exogen FSH Ovarian Reserve Test (EFORT): Bazal E2 ve FSH düzeylerine bakılır. Mensrual siklusun 3. gününde 300 IU FSH uygulaması sonrası E2 cevabı değerlendirilir (110, 111).

- GnRH Agonist Stimulasyon Testi (GAST): GnRH uygulaması sonrası üçüncü günde E2 seviyesi değerlendirilir (110, 111).

***b. Ovulasyonun tespitine yönelik testler:***

Bazal vücut sıcaklığı: Ovulasyonda vücut sıcaklığında 0.1-0.3°C artış olur.

Progesteron seviyesi: >6 ng/ml değeri normal bir ovulasyonu gösterir.

Servikal mukus: Ovulasyon döneminde E2'nin etkisiyle servikal mucus sulu, akışkan ve bol miktardadır. Spinbarket artmıştır. Mukus lam üstünde kuruduğu zaman eğrelti otu görüntüsü oluşur.

USG: Folikül gelişimi, AFC, over hacmi ve ovulasyonun non-invaziv olarak değerlendirilmesini sağlar. Over hacmi reproduktif çağda yaklaşık 6 ml civarındadır. 41 yaşından itibaren belirgin olarak azalır. Ayrıca 41 yaşından sonra Dopler USG ile ovaryan stromal kan akımının azaldığı görülür (110, 111).

Endometriyal biyopsi: Doku örneği histopatolojik olarak olması gereken günle uyumluluk açısından değerlendirilir. Muhtemel bir gebelik ve abortus ihtimali olması nedeniyle menstrual kanamanın birinci gününde yapılması tercih edilir (112).

***c. İmmünolojik faktörlerin değerlendirilmesine yönelik testler:***

Antiposfolipin antikorlar (APA), antitroid antikorlar (ATA) ve tiroid antimikrozomal antikorların (AMA) varlığı değerlendirilir.

***d. Uterus ve tubal anatomiye değerlendirmesine yönelik testler:***

HSG, USG ve Laparaskopi 'dir.

***e. Endokrin testler***

***f. Cinsel fonksiyon bozukluklarının değerlendirilmesi***

*g. Genetik testler*

*h. Enfeksiyonların değerlendirilmesi*

*i. Değiştirilebilir faktörlerin değerlendirilmesi;*

Vücut kitle indeksi, sigara, alkol, kafein, kullanılan ilaçlar, ağır stres, diyet alışkanlıkları, ağır egzersiz ve D vitamini seviyesi gibi faktörlerin değerlendirilmesi önemlidir (110).

*j. Hepatit paneli ve Human Immunodeficiency Virus (HIV) taraması;*

Hasta ile temastaki sağlık personelini, bebeği ve çiftleri korumaya yönelik olarak yapılması önemli bir taramadır (113).

### **2.1.5 İnfertilitede tedavi yaklaşımı ve üremeye yardımcı tedavi yöntemleri**

İlk yapılacak test kolay, ucuz, non invaziv olması nedeniyle tercih edilen semen analizidir. Semen analizi sonuçlarına göre uygulanacak ART karar verilir (114).

Birçok yardımcı üreme tedavi yöntemi vardır. Bunların bazıları günümüzde kullanılmayan tarihsel öneme sahip yöntemlerdir.

#### **Yardımcı üreme teknikleri (ART)**

İntra Uterin İnseminasyon (IUI), İn Vitro Fertilizasyon (IVF), Gamet İntrafallopian transfer (GIFT), Zigot İntrafallopian Transfer (ZIFT), Pronükleer Stage Transfer (PROST), Tubal Embriyo Transferi (TET), Zona Drilling (ZD), Parsiyel Zona Diseksiyonu (PZD), Subzonal Sperm İnsersiyonu (SUZI), Mikromanipulasyon Yöntemleri, İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI), Mikrocerrahi yöntemi ile Epididimal Sperm Aspirasyonu (MESA), Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE), Raund Spermatozoid Enjeksiyonu (ROSI) ve Raund Spermatozoid Nükleus Enjeksiyonu (ROSNİ) sayılabilir (115).

### ***Intrauterin İnseminasyon (IUI)***

Tubal faktör, servikal faktör, cinsel fonksiyon bozuklukları, hafif endometriozis, hafif erkek infertilite faktörü ve açıklanamayan infertilitesi olan hastalarda başvurulan yardımcı üreme tedavi yöntemi IUI'dır (116). IUI için ovulasyon indüksiyonu yapılmasının nedeni, daha çok folikül, oosit ovulasyonu, fertilizasyon ve gebelik şansı elde etmektir. Ovaryan hiperstimülasyon; klomifen sitrat veya gonadotropinlerle yapılır (117). Ovulasyon stimülasyonu uygulanan hastalar ultrasonografi ile folikül gelişimi açısından takip edilir. Foliküller yaklaşık 18 mm çapa ulaştığında hastalara subkutan (SC) hCG enjeksiyonu uygulanarak ovulasyon tetiklenir. hCG uygulamasından 32-36 saat sonra sperm hazırlama teknikleri ile hazırlanmış motil spermeler serviksten geçirilen bir kateter vasıtasıyla uterin kavite içine transfer edilerek gebelik oluşması beklenir (116).

### **Ovaryan fizyolojisi ve ovaryan stimülasyonu**

Hipotalamus salgıladığı hormonlar ile seksüel döngü, gebelik, laktasyon, büyüme ve emosyonel tepkileri kontrol eder. Hipotalamik nükleuslardan pulsatil salgılanan gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH), hipofiz hücrelerinde bulunan reseptörlerine bağlanır. Hipofizden  $\alpha$  üniteleri aynı,  $\beta$  alt üniteleri farklı olan LH, FSH ve tiroid stimüle edici hormon (TSH) gibi hormonlar salgılanır. Puberte ile birlikte pulsatil salınan GnRH aktivitesinin tetiklediği hipotalamo-hipofizer gonadal aks çalışmaya başlar. Overlerde ise steroid hormonlar salgılanır. Bu durum FSH folikül gelişimi ve olgunlaşmasını sağlar. Granüloza hücrelerindeki LH/hCG reseptörlerinin işlevini artırır. Overlerden salınan inhibin B de FSH'nin salınımını azaltır. LH teka hücrelerinde steroidogenezi başlatarak ovulasyonu tetikler. Salgılanan androjenleri granüloza hücreleri östrojene dönüştürür. E2 LH'nin folikül hücresi üzerindeki etkisini artırır. E2 düzeyinin düşmesi LH ve FSH salgılanmasını artırırken, yükselmesi ise LH ve FSH'ı azaltır. E2 yükselmesi negatif feedback etkisi ile hipotalamo-hipofizer aksdan gonadotropin salınımını azaltır. Ayrıca LH kolesterolden progesteron salgılanmasını sağlar. Böylece ovulasyondan sonra folikülde östrojen ve progesteron baskın hale gelir. Progesteronun yükselmesi LH ve FSH'ı azaltır. Ayrıca inhibin B ve E2 etkisi ile FSH düşer. FSH'nin bu düşüşü sadece en gelişmiş folikülü etkilemekle kalmaz, diğerleri ise atraziye uğrarken bu

en gelişmiş dominant folikül büyümeye devam eder. Folikül daha çok E2 ve inhibin üreterek tek başına büyürken, diğerleri ise atreziye uğrar. Bu folikül gelişimi ve dominant folikülün seçimi puberte öncesi başlayarak menapoza kadar devam eden uzun bir süreçtir (118).

### **Yardımcı üreme tedavilerinde kontrollü ovaryan hiperstimülasyon**

Temel yaklaşım FSH konsantrasyonunu artıran çeşitli preparatlar kullanarak çok sayıda dominant folikül gelişmesini sağlamaktır. Altta yatan patolojiye bağlı olarak farklı yöntem ve preparatlar kullanılabilir (7).

### **Kontrollü ovaryan hipersitimülasyon protokolleri (KOH)**

Klomifan sitrat, uzun, kısa ve ultra kısa etkili GnRH agonistleri veya GnRH antagonistleri gibi moleküllerdir. Uygun protokol ile ovaryan sitimülasyon yapılan hastalar seri transvajinal ultrasonografi takibi ile folikül gelişimi açısından değerlendirilir. Ayrıca kan testleri ile hormonlar (E2, LH ve progesteron serum seviyeleri) değerlendirilir. Dominant folikül çapı 18 mm ulaştığında ya da 14 mm'den daha büyük iki folikül olduğunda, endometrium kalınlığı 8 mm ulaştığında, folikül başına düşen E2 seviyesi 100-150 pg/ml olduğunda, hCG veya recombinant LH enjeksiyonu SC yapılır. Enjeksiyonundan yaklaşık 34-36 saat sonra oositler oosit toplama işlemi ile toplanır (7).

### **Oosit Toplama İşlemi (OPU; Oosit Pick Up)**

Her hasta folikül sayısı açısından değerlendirilmeli ve muhtemel oosit sayısı belirlenmelidir. Laboratuvar hazırlığı bir gün öncesinde bu sayıya göre planlanmalıdır. Laboratuvarda gerekli önlemlerin alınabilmesi için HIV, Hepatit B, Hepatit C gibi bulaşıcı hastalıkların tarama testleri yapılarak test sonuçlarının laboratuvar ekibine önceden bildirilmiş olması önemlidir (119).

OPU öncesi ayrıntılı USG yapılarak anatomik yapılar, folikül çapı ve vajinal enfeksiyon değerlendirilir. Hasta 6 saatlik açlığı takiben, damar yolu açık, mesanesi boş olarak anestezi prosedürüne alınır. OPU odası USG'nin rahat yapılabilmesi ve oositlere zarar vermeyecek aydınlata olmalıdır (120). Vajinal temizlik oosit için

toksik olmayan maddelerle yapılmalıdır. Transvajinal USG eşliğinde OPU iğneleri ile foliküller aspire edilir. Aspirasyon nazikçe iğnenin ani hareketlerinden kaçınılarak yapılmalıdır. Bu işlem, klinik tecrübe, teknik bilgi ve beceri gerektiren bir işlemdir. Aspirasyon işleminde en yaygın olarak tek lümenli 17-18 gauge iğnesi tercih edilir. Kullanılan yıkama kültür medyumu 37°C sıcaklıkta olmalıdır. Aspire edilen foliküler sıvı boru sistemi ile test tüplerine alınır. Bu esnada tüplerin soğuğa maruz kalmaması önemlidir. Test tüpü ısıtıcısı OPU odasında hazır bulunmalıdır (121). Aspirasyon için 100-200 mmHg arası basıç kullanılabilir. Ancak en ideal olanı 140 mmHg basınçdır (122). Tüpler embriyoloji labaratuvarına ısısı korunarak iletilir. Önceden ısıtılmış petri kaplarına aktarılan foliküler sıvı stereo-mikroskop altında değerlendirilir. Embriyolog oosit sayısı ve boş folikül sayısı bilgisini klinisyenle paylaşmalıdır (120).

### **Oositin değerlendirilmesi**

Kümüls-ooisit kompleksi embriyoloji uzmanı tarafından IVF/ICSI yapılabilmesi için bir takım işlemlere ve morfolojik değerlendirmeye tabi tutulur. Oosit ve etrafındaki kümülüs korona hücre topluluğunun morfolojik değerlendirmesi konvansiyonel IVF’ de çok değerlidir. Ancak günümüzde ICSI yönteminin yaygın kullanımı ile güncelliğini kaybetmiştir (123).

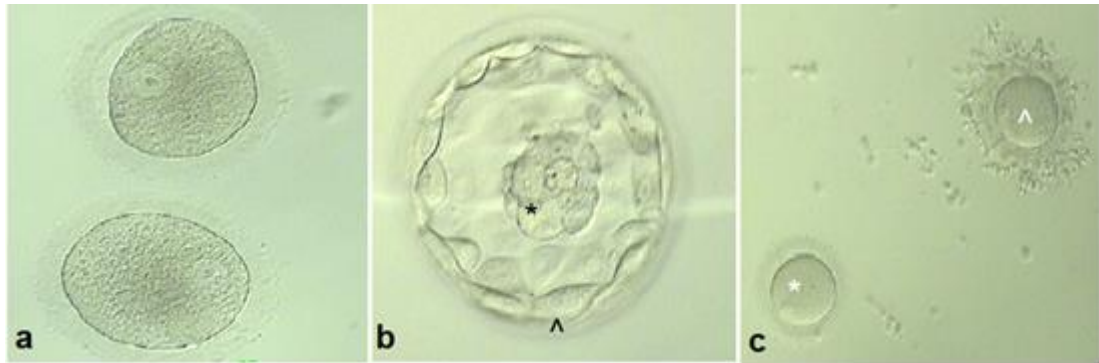
Embriyonun kalitesi ve implantasyon başarısını belirleyen temel unsurlardan birisi gamet kalitesidir (123). Oosit kalitesi, oositin matürasyonu ve morfolojisi ile birlikte değerlendirilir. Oosit matürasyonu nükleer matürasyon ve sitoplazmik matürasyon olmak üzere ikiye ayrılır.

*Nükleer matürasyon*; 2. Mayozun metafaz safhasının tamamlanmasıyla sonlanır (124). Değerlendirilmesi nispeten daha kolaydır. Oositler nükleer matürasyonlarına göre morfolojik açıdan germinal vezikül (GV), immatür (M1) ve matür oosit (M2) olarak sınıflandırılır (Şekil 1) (125). Birinci Mayoz bölünmenin profaz evresindeki kromozomları yoğunlaşmış, büyük nükleuslara sahip primer oositlere germinal vezikül (GV) denir. Preovulatar LH piki ile GV’ler yıkılır. Germinal vezikül yıkılması (GVBD) sonrası nükleer matürasyonunu tamamlayamayan ve 1. kutup cisimciğilerini (1.PB) atamarak, 1. Mayoz bölünmenin metafaz 1’de bekleyen

oositlere ise metafaz 1 oosit (immatür oosit) denir (123). İmmatür oositler 1. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak 1. kutup cisimciklerini atar ve metafaz 2 evresinde duraksayınca matür oosit (M2) adını alır. Siklin B, p34 gibi moleküller Oosit olgunlaşma faktörü (MPF)'nün aktive olmasını, germinal veziküllerin yıkılmasını, metafaz 1'den metafaz 2'ye geçişi sağlayarak nükleer matürasyonun tamamlanmasını sağlar (124). Sadece matür oositler fertilize olabilmeye yeteneğine sahiptir. Bu nedenle sadece matür oositlere IVF/ICSI işlemi yapılabilir (124).

Ancak nükleer matürasyonunu tamamlamış olması bir oositin, fertilizasyon yeteneğini kazandığının kesin göstergesi değildir. Bunun için oositin sitoplazmik matürasyonunu da tamamlaması gerekmektedir. Sitoplazmik matürasyonun değerlendirilmesi ise çok daha zordur (124, 126).

*Sitoplazmik matürasyon*; Oositin fertilizasyon için sitoplazmik hazırlığını tamamlaması olayıdır. Ovulasyon öncesinde oositte transkripsiyon ve translasyonun olduğu metabolik döngü, oositi fertilizasyon ve embriyo gelişimi için hazır hale getirir (127). Sitoplazmik matürasyonun, nükleer matürasyondan farklı olarak morfolojik ayırt edilmesi oldukça güçtür. Ancak tecrübeli ve dikkatli uzman kişiler, ICSI işlemi esnasında ooplazmasının mikroenjeksiyon pipetine akış özelliğine, işlem sonrası oositin eski küresel yapısına hızla geri dönebilmesine, mikroenjeksiyon pipetinin oosit giriş-çıkış yerinde oluşturduğu üçgenimsi görüntüye bakarak değerlendirme yapabilir (124).



**Şekil 1.** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden invert mikroskop altında çekilmiş fotomikrograf örnekleri: a) iki GV oosit (20X), b) siyah yıldız: ICM, siyah okbaşı: Trofektoderm (40X), Fc) beyaz yıldız; 135µm çaplı pipetle denudasyon sonrası M2 oosit (10X), beyaz okbaşı 140µm çaplı pipetle denudasyon sonrası M2 oosit görülmektedir.

## **Oosit dismorfizmi**

Oosit dismorfizmi, oositin nükleer matürasyonunun mikroskopik incelenmesi esnasında oositte izlenen morfolojik anomalilere verilen isimdir. Oosit dismorfizmi fertilizasyon güçlüğü, anöplidi ve embriyo gelişim problemlerine sebep olabileceği için önemli bir patolojik durumdur. Oositin morfolojik olarak, sitoplazmik ve ekstrasitoplazmik alanları mikroskop altında incelenir. Ekstrasitoplazmik alan değerlendirmesinde, düzensiz şekil, zona pellusida, 1. kutup cisimciğinin yapısı ve perivitellin aralık gibi özellikleri kullanılır. İntrasitoplazmik alan değerlendirmesinde ise, germinal vezikül, sitoplazmik inklüzyon cisimleri, agranüler endoplazmik retikulum (aER), vakuol, vezikül, refraktil cisimcik varlığı, sitoplazmanın homojenitesi, rengi ve negrotik bölgelerin varlığı belirlenir (124).

## ***In Vitro Fertilizasyon***

Kadın üreme hücresi olan oosit ve erkek üreme hücresi olan spermatozoanın insan vücudu dışında laboratuvar ortamında biraraya getirilerek döllenmesi işlemidir (24, 128). Günümüzde iki teknik; Konvansiyonel IVF ve ICSI yaygın olarak kullanılmaktadır (129).

### ***Konvansiyonel (Klasik) IVF:***

*In vivo* fertilizasyonun, *in vitro* ortamda taklit edilmesidir. KOH sonrası OPU ile toplanan COC, kültür medyumuna ile yıkanarak bir petri kabına alınır. Sperm hazırlama teknikleri ile hazırlanmış olan spermle birlikte oositler, bir gece inkübatörde inkübe edilerek fertilizasyonun kendiliğinden gerçekleşmesi beklenir. Ertesi gün kümülüs hücrelerinden ayrıştırılarak oositin fertilize olup olmadığı kontrol edilir. Konvansiyonel IVF'deki fertilizasyon, *in vivo* fertilizasyon ile benzerdir. Fertilizasyonun göstergesi olan 2 pronükleus (2PN) değerlendirmesi yaklaşık 18-20. saatlerde yapılır (8). Fertilizasyonun görülmediği durumda ise oositler, ICSI yöntemi ile tekrar döllenabilir. Ancak yapılan çalışmalarda bu embriyolarda daha çok PN anomalilerinin (3PN, Multipronükleus gibi) görüldüğü bildirilmiştir (130). Konvansiyonel IVF için OPU işlemi SC, hCG veya GnRH agonisti protokolü ile ovulasyon tetiklendikten yaklaşık 34-38 saat sonra gerçekleştirilir (131, 132).

Toplanan folikül sıvısı petri kabına alınarak stereomikroskop altında incelenir. COC kan pıhtılarından arındırılarak COC olgunluğu değerlendirilir. İnseminasyon yağ altında gerçekleştirilir (8). Sperm hazırlama protokolleri ile hazırlanmış 100,000-250,000/mL konsantrasyondaki spermler ve COC, inseminasyon için dropa eklenir. Yaklaşık 15-17 saat fertilizasyonun gerçekleşmesi beklenir. İnseminasyondan yaklaşık 18-20 saat boyunca oosit etrafında henüz dökülmemiş olan kümülüs hücreler 140-150µm çap açıklığına sahip pipetlerle nazikçe mekanik olarak temizlenir. Oosit/zigot, temiz medyumunda yıkanarak önceden hazırlanmış ve dengelenmiş kültür medyumunu içeren yeni bir petri kabına alınır (8, 132, 133).

### ***İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)***

İlk defa ICSI işlemi, Gianpiero D. Palermo tarafından 1991 yılında bir hastasına SUZI yaparken yanlışlıkla spermi oosit içine enjekte ettiğini ve fertilizasyon gördüğünü iddaa etmesi ile gündeme gelmiştir. Şiddetli erkek infertilitesi olan hastalarda 1992 yılından itibaren ilk tercih edilen yöntemdir (134).

KOH sonrası oosit toplanma prosedürü konvansiyonel IVF ile aynıdır. Ancak COC'nin işlem için hazırlanması farklı bir prosedür gerektirir. OPU ile toplanan COC bir seri mekanik ve kimyasal işleme tabi tutulur. Hyaluronidaz içeren HERPES tamponlu ortamda 30-60 sn muamele edilir. COC, farklı çap açıklıklarına sahip elle hazırlanmış cam pipetler veya plastik standart çaplı pipetlerden geçirilerek soyulur. Oositin etrafındaki kümülüs hücrelerinden bu şekilde arındırılması işlemine denudasyon adı verilir. Denude edilen oositler temiz kültür medyumunu içeren droplarda yıkanır. Etrafındaki granüloza ve kümülüs hücreleri uzaklaştırılan oositin nüleer matürasyonu ve morfolojik özellikleri, 200X büyütme altında invert mikroskopda kolayca değerlendirilebilir (8). ICSI işlemi için en ideal zaman SC hCG uygulamasından 37-41 saat sonra yani OPU'dan yaklaşık 3-5 saat sonradır (135). 200X-400X büyütme altında invert mikroskopda Hoffman Modülasyon Kontrast Sistemi kullanılarak matürasyonlarını tamamlamış M2 oositlere ICSI yapılır (136). ICSI petrisi, ısıtılmış tabla üstüne yerleştirilir. Spermlerin bulunduğu dropdan tek bir hareketli ve iyi morfolojiye sahip sperm hücresi seçilir. Mikropipet içine aspire edilerek droptan alınır. Sperm hareketlerini azaltan polivinilpirolidon (PVP) medyum drobuna konularak, sperm kuyruğu mikropipet hareketi ile kırılır. Sperm

kuyruğunun kırılması sperm, membranının stabilitesini bozarak akrozomal reaksiyona yol açar. Böylece oosit aktivasyonuna yardımcı olur (8, 137).

Kuyruğu kırılan sperm kuyruk kısmından aspire edilerek mikropipete yerleştirilir. Oosit oosit tutma pipeti ile vakumlanarak sabitlenir. Bu esnada polar cismin saat 6 ya da 12 hizasında olmasına özen gösterilir. Sperm yüklü mikropipet, saat 3 hizasındaki zona pellusida delinerek ve perivitellin aralık geçilerek, oosit içine doğru ilerletilir. Ooplazma hafifçe mikropipet içine aspire edilerek plazma zarının yırtılması sağlanır. Sperm ooplazma içine bırakılarak oositin nazıkçe çıkılır. İşlem sonrası oositler temiz bir dropda yıkanır. Kültür medyumunu içeren yeni bir petri kabına aktarılarak inkübe edilir (8,138). ICSI yöntemi ile konvansiyonel IVF 'den farklı olarak, bir çok fertilizasyon basamağı atlanır. Bu nedenle fertilizasyon göstergesi olan 2PN değerlendirilmesi daha erken bir sürede yaklaşık olarak 16-18. saatde yapılır (8). Erkek infertilite faktörü olan vakalarda ICSI yöntemi sayesinde, normalde fertilizasyon şansı çok düşük olan spermlele bile fertilizasyon elde edilebilir. Bu nedenle fertilizasyon başarısı çok yüksektir. Ancak erkek infertilite faktörü dışlandığında konvansiyonel IVF'de blastosist gelişim, implantasyon ve gebelik oranlarının daha yüksek olduğu görülür (18-22). İstenmeyen bir sonuç olarak ICSI'de oosit dejenerasyon oranı konvansiyonel IVF'e göre çok daha yüksektir (139).

### **IVF ve ICSI için sperm hazırlama yöntemleri**

*İn vivo* koşullarda kadın üreme sistemine bırakılan spermlelerin, sadece fertilizasyon yeteneği en yüksek olan bir kısmı servikal mukus engelini geçerek fallop tüplerine ulaşabilir. Çoğu sperm, vajen rugalarında takılır ve canlılığını kaybeder. Servikal mukusu geçerek hızla oosite doğru hareket eden az sayıda spermleler, kadın üreme sistemi içinde kapasitasyona uğrayarak fertilizasyon yeteneği kazanırlar. *İn vitro* koşullarda yüksek fertilizasyon yeteneğine sahip sperm seçimi, morfolojileri ve hareketlilikleri değerlendirilerek yapılır. Spermleler *in vitro* koşullarda kapasitasyon yeteneğini, *in vitro* koşullarda ancak sperm hazırlama protokolleri sonrası kazanabilirler (140).

Günümüzde en çok tercih edilen sperm hazırlama protokolleri; yıkama, yüzdürme (swim-up, swim-down) ve dansite-gradyent santrifügasyonudur (DGS). Hangi tekniğin hastaya daha uygun olduğuna, spermiogram sonrası ölçülen değerlere bakılarak karar verilir (141).

#### *Yıkama (Washing)*

Spermiler, seminal sıvı ve içerisindeki lökosit, epitel gibi çeşitli hücreler, bakteriler, virüsler ve prostaglandin gibi maddelerden uzaklaştırılır ve konsantrasyonu artırılmaya çalışılır. Sperm örneği, konik tüplerde 300-400 g'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edilir. Dibe çöken pellet, üzerine kültür sıvısı eklenerek yıkama tekrarlanabilir. Yıkama tek başına yapılabileceği gibi, swim-up ve gradyent uygulamasıyla birlikte de yapılabilir (141).

#### *Yüzdürme (Swim-up, swim-down)*

Hareketli spermleri seçmeyi amaçlayan bir yöntemdir. Yıkılarak hazırlanmış sperm örneği, konik tabanlı tüpler ile 45° eğimli, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörlerde yaklaşık bir saat inkübe edilerek, hareketli spermlerin yüzmesi sağlanır (141).

#### *DGS (Dansite-gradyent santrifügasyon)*

Albumin, Percoll, sükröz, Nycodenz gibi farklı yoğunluktaki sıvılar ile katmanlar oluşturulur. Genellikle %40 / %80 ya da %50 / %90 konsantrasyonda sıvılar kullanılır. Santrifüj sonrası normal yapıya sahip spermlerin, bu katmanlardan süzülerek konik tüpün dibine çökmesi ile ayrışması beklenir (141).

#### **Testiküler dokudan sperm elde edilmesi (TESE, MESA)**

Doku örnekleri, ilk olarak HEPES içeren kültür sıvısı ile yıkanarak, eritrositler ve serbest oksijen radikallerinden (SOR) ayrıştırılır. Steril ortamda stereomikroskop altında insülin enjektörü ucu kullanılarak diseksiyon işlemi ile tübüller parçalanır ve spermatogenetik seri hücreleri açığa çıkarılmaya çalışılır. Çok sıkı testiküler dokuya sahip olan örneklerde dokuya gömülü spermatogenetik seri hücreleri, tripsin / DNase ve tip 1 kollajenaz gibi enzimler kullanılarak, dokudan ayrıştırılmaya çalışılır. Elde edilen dokular, pipetle toplanarak 30 sn kadar vorteksle karıştırılır. %5 CO<sub>2</sub> içeren

inkübatörlerde yaklaşık bir saat inkübe edilerek, konik tabanlı tüplerde santrifüj edilir. Elde edilen materyal yıkanır, invert mikroskop altında dikkatlice taranarak, spermatogenetik seri hücrelerinin varlığı araştırılır. Tespit edilen spermier medium drobuna alınarak ICSI işleminde kullanılır (140).

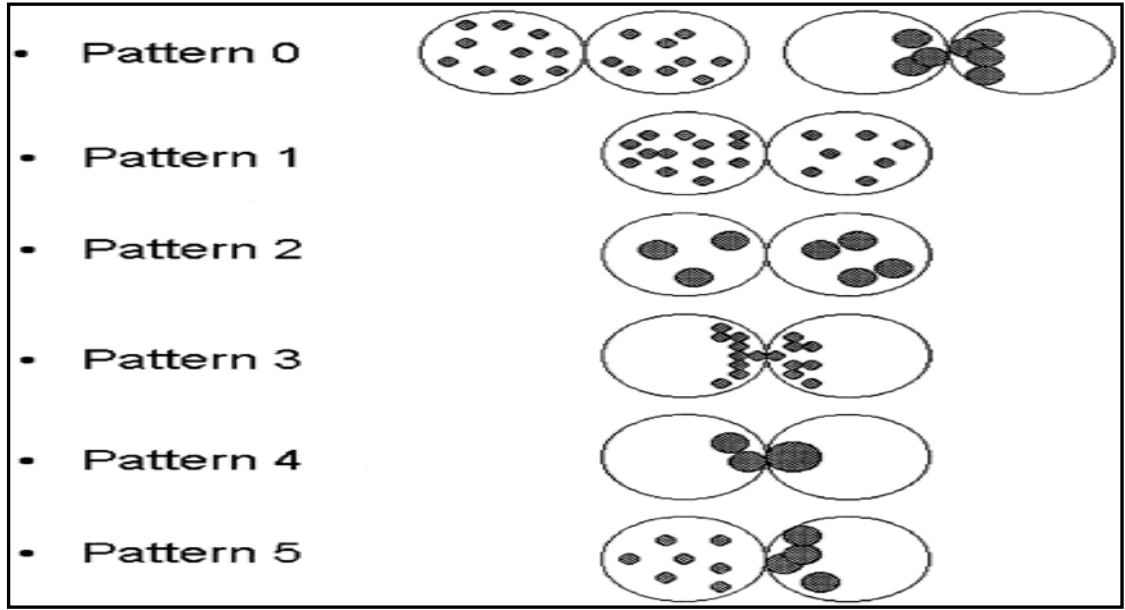
### **Fertilizasyon**

Her iki yöntemde de fertilizasyonun gerçekleşmesi için oosit aktivasyonu şarttır (139). Oositin aktivasyonu, oosit ve spermier çekirdek ve sitoplazmasının bir araya gelmesiyle başlayan ve pronükleus oluşumu ile devam eden bir takım moleküler ve yapısal değişiklikler bütünüdür (142, 143). Fertilizasyon, birbirini takip eden bir dizi evreden oluşur. Fizyolojik olarak, *in vivo* ortamda spermier sadece %1'i oosite ulaşır ve kümülüs hücrelerinin etrafını sarar. Spermier, kümülüs hücrelerini geçmesi ilk basamaktır. Daha sonra sperm hücresi zona pellusidaya, önce primer daha sonra sekonder bağlanır. Zona pellusida'ya spermier bağlanması ile akrozom reaksiyonu başlamış olur. Sperm başındaki akrozomal enzimler serbestleşerek ve zona pellusidayı eritir. Daha sonra, spermier ekvatoryal plazma zarı ve oositin plazma zarı birleşir. Sperm, oosit içine Oosit Aktive Edici Faktörü (OAF) gönderir. OAF oositi aktive eder. Oosit sitoplazmasında  $Ca^{+2}$  seviyelerinde dalgalanmalar görülür. İntrasellüler  $Ca^{+2}$  artışı, ooplazma altındaki kortikal granüllerin ekzositozla içeriklerini perivitellin aralığa boşaltmalarını sağlar. Bu olaya kortikal reaksiyon adı verilir (139, 143). Boşaltılan enzimler zona pellusida da değişikliklere neden olur. Bu olaya ise zona reaksiyonu adı verilir. Spermier oosit içine girmesinden sonra nükleer membranı parçalanır, kromatin açığa çıkar ve dekonpensasyon gerçekleşmeye başlar. Oosit sitoplazmasındaki glutatyon yardımıyla, disülfid bağlarının redüksiyonu, protaminlerin fosforilasyonu ve oosite ait histonların protaminlerle yer değiştirmesi işlemine dekonpensasyon adı verilir (144). Dekonpensasyon sonrası erkek ve dişi pronükleuslar oluşur. Bu olay yaklaşık olarak fertilizasyondan 3-10 saat sonra gerçekleşir. Erkek ve dişi pronükleusların görülmesi, fertilizasyonun kanıtıdır (139, 142, 143). Anne ve babadan gelen genlerin birleşmesi neticesinde yeni bir genetik yapıya sahip zigot oluşmuş olur (143).

### **Pronükleer evredeki oositin değerlendirilmesi**

Bu evrede oosit, 2. Mayoz bölünmesini tamamlayarak ikinci polar cisimciğini atar. Erkek ve dişi pronükleuslar oluşarak, kaynaşırlar. Oositin inseminasyonundan 18-20 saat sonra, zigotun orta hat hizasında 2 tane pronükleus görülür. Pronükleuslar içinde ise nükleolar prekürsör cisimler (NPB) bulunur. Pronükleusların içindeki NPB'in sayısı ve pozisyonu, morfolojik değerlendirme için önem arz eder (145).

European Society for Human Reproduction and Embryology'nin (ESHRE) İstanbul Konsensusunda morfolojik özelliklerin zamanla ilişkili olması nedeniyle zigot skorlamasının yapılması gerektiği bildirilmiştir (151). Zigot skorlama sistemi ile morfolojik değerlendirmede bakılacak parametreler şunlardır; sitoplazmik halo ve sitoplazmanın değerlendirilmesi, pronükleusların sayısı, büyüklükleri, hücre içinde buldukları pozisyonlar, NPB'in sayısı, dağılımı ve büyüklükleri, kutup cisimciklerinin şekli, pozisyonu ve sayısı. Sitoplazmik halo oosite ait organellerin, oositin kortikalinden merkeze doğru yer değiştirmesiyle oluşan görünüme verilen isimdir. Sitoplazmik halo varlığı tek başına ferilizasyon açısından yeterli bir gösterge olmamasına rağmen, iyi kaliteli bir embriyonun gelişimi için pozitif gösterge olarak kabul edilir (145, 146). Sitoplazmanın homojen olması tercih edilir. Çok sayıda vakuol, refraktil cisim ve vezikül içermesi kötü embriyo gelişimini düşündürür. Erkek ve dişi pronükleusların eşit büyüklükte olması, zigotun merkezinde görülmeleri ve birbirine bitişik olmaları iyi kalite embriyo gelişimini düşündürürken, tam tersi durumda ise sentrozom bozukluğu ve kötü kalite embriyo gelişimini düşündürür. Üç ve daha fazla sayıda pronükleus ile her 2 pronükleusun büyüklüklerinin birbirinden çok farklı olması anöploid olasılığını yükselttiğinden bu durum kötü embriyo kalitesi lehinedir (142, 147).



**Şekil 2.** Tesarik ve Greco'nun zigot skorlaması sistemi (148).

Tesarik ve Greco'nun zigot skorlaması sistemi ile pronükleus ve NPB'in morfolojisine (Şekil 2) bakılarak embriyo kalitesi değerlendirilir (148). Ayrıca kutup cisimcikleri ile PN'lerin arasındaki pozisyonel açı da değerlendirilir. PN'leri orta eksenlerden kesen bir çizgi ile 2. Kutup cisimciği arasındaki açı  $\beta$  açısı adını alır.  $\beta$  açısı büyüdükçe embriyo kalitesi düşer ve kromozomal anomali riski artar (149).

### **Bölünme evresindeki 2. gün ve 3. gün embriyoların değerlendirilmesi**

ART'de asıl amaç tek bir embriyo transferi ile sağlıklı bir bebek elde edilmesi olduğundan en iyi kaliteye sahip embriyonun tespiti önemlidir. Bu amaçla embriyolar morfolojik olarak değerlendirilir (150).

Fertilizasyon sonrası oluşan hücreye zigot adı verilir. Zigot, mitotik bölünmeler geçirerek sırasıyla 2 hücreli, 4 hücreli ve 8 hücreli embriyoyu (Şekil 3) oluşturur. Embriyoyu oluşturan hücrelere blastomer adı verilir. *In vitro* ortamda fertilizasyon değerlendirmesinden sonra her 24 saatte bir embriyolar, embriyologlar tarafından blastomer sayısı, boyutları, fragmentasyon yüzdesi, bölünme hızı, blastomerlerin nükleer ve sitoplazmik özellikleri, perivitellin aralık ve zona pellusida özellikleri ve erken kompaktlaşma gibi faktörler açısından değerlendirilirler (145,147).



**Şekil 3.** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden invert mikroskop altında çekilmiş fotomikrograf örnekleri: a) ICSI (20X), b) 2PN (40X), c) Üçüncü gün grade I embriyo (20X)

Alpha - Scientists in Reproductive Medicine (ALPHA) /European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) konsensusunun önerdiği embriyo değerlendirme zaman aralıkları aşağıdaki gibidir:

- Fertilizasyon değerlendirilmesi:  $17\pm 1$  saat ; PN (Şekil 3)
- Singami değerlendirilmesi:  $23\pm 1$  saat; %50 görülmesi beklenir.
- Erken bölünme değerlendirilmesi: ICSI'de  $26\pm 1$ , IVF'de  $28\pm 1$  saat ; 2 blastomerli
- İkinci gün embriyo değerlendirilmesi:  $44\pm 1$  saat; 4 blastomerli
- Üçüncü gün embriyo değerlendirilmesi:  $68\pm 1$  saat; 8 blastomerli
- Dördüncü gün embriyo değerlendirilmesi:  $92\pm 2$  saat; Morula
- Beşinci gün embriyo değerlendirilmesi:  $116\pm 2$  saat; Blastosist (147).

Zigot, 24-28 saat içinde ilk bölünmesini gerçekleştirmemiş ise bu embriyoların implantasyon potansiyelleri oldukça düşüktür. Bölünmesi geç kalan embriyolarda kromozomal anomaliler sık gözlenir. Embriyoların bölünme hızlarının beklenilenden çok yavaş veya çok hızlı olması implantasyon açısından kötü prognoz göstergesi olup istenmeyen bir durumdur (145).

Yarıklanma döneminde embriyolar embriyo skorlama sistemleri kullanılarak morfolojik olarak değerlendirilirler. Yarıklanma dönemi embriyo değerlendirilmesi ALPHA/ESHRE konsensus ilkeleri temel alınarak embriyoların blastomer sayıları, blastomer büyüklükleri ve fragmantasyon yüzdelere göre yapılır (151).

- İyi kalite embriyo; Fragmantasyon < %10, Multinükleasyon (MN) yok, hücre boyutu günü ile uyumlu.
- Orta kalite embriyo; Fragmantasyon %10-%25, MN yok, hücrelerin boyutlarının çoğunluğu günü ile uyumlu.
- Kötü kalite embriyo; Fragmantasyon > %25, MN var, hücrelerin boyutları günü ile uyumlu değil.

İyi kalite embriyolar, fragmantasyon oranının düşük ya da fragmantasyonun hiç bulunmadığı, hücre sayısının beklenen günle uyumlu olduğu ve blastomer hacimlerinin eşit büyüklükte, sitoplazmanın homojen olduğu embriyolardır. İkinci günde 4 blastomerli ve üçüncü günde 8 blastomerli embriyolar yukarıdaki kriterlere göre iyi, orta, kötü kalite olarak sınıflandırılır (151).

#### **Dördüncü gün embriyolarının değerlendirilmesi**

12-16 hücreli embriyoya morula adı verilir. Morula aşamasındaki embriyoda hücreler arası sıkı bağlantı komplekslerinin geliştiği ve hücreler arası sınırların net seçilemediği kompaktlaşma dönemi görülür. Son zamanlarda 4. Gün embriyolarının da transfer edilmesi gündeme gelmiştir. Erken kompaktlaşma, embriyonun iyi bir implantasyon yeteneğine sahip olduğunu gösterebilir (145).

#### **Blastosist evresindeki embriyoların değerlendirilmesi**

Kompaktlaşmadan sonra kavitasyon dönemi başlar. Kavitasyon, hücreler arasındaki boşluklardır. Kavitasyonun görüldüğü embriyo artık blastosist adını alır. Kavitasyonlar birleşerek, blastosel boşluğunu oluşturur. Blastomerlerden açığa çıkan sıvı blastosel boşluğunu doldurur. Blastosel boşluğu büyüdükçe, blastomerler 2 farklı yapı halinde farklılaşmaya başlarlar. İçteki blastomerlerden oluşan, hücre kitlesine iç hücre kitlesi (ICM) adı verilir. Zona pellusidanın hemen altında sıralanan ve blastosel boşluğunu çevreleyen hücrelere ise trofektoderm adı verilir. Gelişimin ileri dönemlerinde iç hücre kitlesinden embriyo, trofektodermden ise plasental yapılar gelişir. *İn vitro* ortamda blastosist aşamasındaki embriyonun morfolojik

değerlendirmesinde; blastosel boşluğu, iç hücre kitlesi ve trofoblastların her üçü de değerlendirilir (Şekil 1) (152, 153).

ALPHA/ESHRE Konsensusu'na göre Gardner ve Schoolcraft blastosist evresi embriyo sınıflaması (147, 151)

- Gelişim evresi grade 1; erken blastosist, blastosel boşluğu embriyo hacminin % 50'sinden az,
- Gelişim evresi grade 2; blastosist, blastosel boşluğu embriyo hacminin % 50'sinden çok,
- Gelişim evresi grade 3; tam blastosist, blastosel boşluğu tamamen embriyoyu kaplamış,
- Gelişim evresi grade 4; egeşleşmiş blastosist, blastosel boşluğu embriyonun hacminden daha büyüktür ve zona pellusida incelmeye başlamış,
- Gelişim evresi grade 5; hatching blastosist, zona pellusida yırtılmış ve blastosist dışarı çıkmaya başlamış,
- Gelişim evresi grade 6; hatched blastosist ve blastosist zona pellusidadan tamamen dışarıya doğru çıkmış,
- ICM (Inner cell mass/ İç hücre kitlesi) grade 1; iyi (A), kompak ve birbirine sıkı paketlenmiş birçok hücre,
- ICM grade 2; orta (B), gevşek olarak biraraya gelmiş hücreler,
- ICM grade 3; zayıf (C), çok az sayıda birbirinden ayrımı güç hücreler,
- Dış hücre kitlesi (Trofektoderm) grade 1; iyi (a), çok sıkı birbirine bağlı, tek katlı yassı çok sayıda trofektoderm hücresi,
- Dış hücre kitlesi (Trofektoderm) grade 2; orta (b), gevşekçe birbirine tutunmuş, az sayıdaki tek katlı yassı trofektoderm hücreleri,
- Dış hücre kitlesi (Trofektoderm) grade 3; zayıf (c), çok az sayıda, gevşekçe birbirine tutunmuş büyük, yassı trofektoderm hücreleri.

Blastokist transferi *in vitro* koşullarda, daha uzun süre gelişimini devam ettiren embriyoların seçilmesine imkan tanır. Blastosist aşamasına ulaşabilen embriyoların daha başarılı ve daha iyi kalite de olduğu söylenebilir. Normal şartlarda *in vivo* koşullarda embriyonun uterin kaviteye ulaşması ve implantasyonu, blastosist aşamasına denk gelir. *In vivo* fertilizasyonda implantasyon, endometriyal

reseptivitenin en iyi olduğu implantasyon penceresi döneminde görülür. İkinci gün ve üçüncü gün embriyo transferine kıyasla, blastosist transferinin endometrium reseptivitesi ile embriyo senkronizasyonun maksimum olması nedeniyle daha avantajlı olduğu söylenebilir (154-156). Traslasyon taşıyan embriyoların gelişimleri gecikeceği için blastosist aşamasına kadar gelişimine devam eden embriyoların günüyle uyumlu ve sağlıklı olanlarının ise sağlıklı muhtemel traslasyon taşıyan embriyolardan ayrımı daha kolay yapılabilmektedir (157).

### **Embriyo Transferi (ET)**

Kullanılan embriyo kültür mediumlarındaki ve kriyoprezervasyon tekniklerindeki gelişmeler neticesinde günümüzde bazı özel durumlar haricinde elektif tek embriyo transferi (eSET) tercih edilmektedir. eSET sayesinde çoğul gebelik ve koplasyonlarının önüne geçilmiş olunur (158).

En uygun embriyo, morfolojik olarak embriyo seçim kriterlerine göre seçilir ve son aşama embriyo transferi aşamasına geçilir. Hasta, hafif sedasyon alabilir. İşlem jinekoloji masasında ve litotomi pozisyonunda, mesane dolu iken transvajinal ultrasonografi eşliğinde trans-miyometriyal veya intrafallopian transfer şeklinde yapılır. Başarılı bir ET için klinik tecrübe ve teknik çok önemlidir. Deneme transferi, uygun kateter seçimi ve servikal mukus temizliği, transfer başarısını artırır. Katetere embriyo yükleme tekniği, tecrübe ve dikkat gerektirir. En çok tercih edilen katetere yükleme ve transfer edilme şekli, embriyoların iki hava dropu arasındaki yaklaşık 20-30µl transfer medyumu dobu içine yüklendiği tekniktir. Embriyo uterus fundusunun yaklaşık 1 cm alt kısmına ultrasonografi eşliğinde dikkatlice nakledilir. ET sonrası kateter stereomikroskop altında kontrol edilmelidir. Kateterde kalan embriyo varsa işlem vakit kaybetmeden dikkatli ve hızlı bir şekilde tekrarlanmalıdır (159, 160).

### **İmplantasyon**

İmplantasyon, blastosist evresindeki embriyonun rahim iç yüzeyine kendini gömmesidir. İmplantasyon, ovulasyondan sonraki yaklaşık 6-11. günlerde endometriyumun reseptivitesinin en uygun olduğu implantasyon penceresi adı

verilen dönemde gerçekleşir. İmplantasyon penceresi, siklusun 19.-24. günleri arası dönemdir. Blastosist *in vivo* koşullarda uterin kaviteye geldiğinde, bir veya iki gün uterin sıvısı içinde yüzer. Bu sırada zona pellusidası yırtılmaya başlar. İmplantasyon ise apozisyon, adhezyon ve invazyon adı verilen üç evrede gerçekleşir. Hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler, adezyon molekülleri, prostoglandinler gibi çeşitli moleküller implantasyonda rol oynar (6, 161-163).

### **Asisted hatching (AH) yöntemi**

*In vivo* koşullarda implantasyon öncesi blastosist, zona pellusidadan ayrılır (hatching). Bu sayede endometriyuma implante olabilir. *In vitro* koşullarda ise embriyonun hatching olarak daha kolay implante olabilmesi için zona pellusidasına küçük bir delik açılması olayına assisted hatching (AH) yöntemi adı verilir. AH sayesinde implantasyonun daha kolay olabileceği düşünülür. Zonal delik (drilling), mekanik, kimyasal veya lazer kullanılarak yapılabilir (24).

### **Kriyoprezervasyon**

Donma işleminden farklı olarak sıfırın altındaki sıcaklıklarda hücrelerin canlılığını koruyarak muhafaza edilmesi ve geri dönüşümüne olanak sağlayan protokoller geliştirilmiştir. Kriyoprezervasyon yöntemi ile erkek ve kadına ait gonadlar, testis ve over dokusu -196 °C sıvı nitrojen tanklarında saklanabilmekte ve hastaların fertilizasyon kabiliyetleri korunabilmektedir (164, 165).

### **Kültür ortamları**

*In vitro* ortamı ne kadar *in vivo* ortama yaklaştırabilirsek, embriyo gelişimi için o kadar uygun bir ortam elde etmiş oluruz. Embriyo gelişim aşamalarında, kadın üreme sisteminin çeşitli bölümlerinde birbirinden farklı ortamlar bulunur. Günümüzde bu ortamları taklit eden birçok kültür medyumu geliştirilmiştir. Kültür medyumları gamet ve embriyoya toksik olmamalı, sperm kapasitasyonunu sağlamalı, sperm motilitesine olumsuz etkisi olmamalı, embriyonun beslenmesi ve gelişimini sağlamalıdır (166).

İmplantasyon öncesi *in vitro* gelişim için kullanılan embriyo kültür medyumları şunlardır; karbonhidrat eklenmiş tamponlu basit tuz solüsyonları, kompleks kültür medyumları, basit kültür medyumları, ardışık medyumlar. Kültür medyumları su, inorganik iyonlar, amino asitler, karbonhidratlar, şelatlayıcılar, antioksidanlar, sitokinler, vitaminler, amonyum, tampon sistemleri, antibiyotikler, hormonlar, büyüme faktörleri, proteinler, glikozaminoglikanlar gibi bir çok molekülü içermektedir (167).

### **Ko-Kültür**

Embriyolar, *in vitro* koşullarda somatik hücrelerle birlikte inkübe edilmesidir. Bu amaçla bir çok hayvan ve insan çalışması yapılmıştır. Ko-Kültür ortamında kullanılan somatik hücreler; uterus fibroblastları, ampuller epitel hücreleri, Vero hücreleri, endometriyal hüceler, oviduktal epitel hücreleri, granüloza hücreleri gibi çok çeşitli hücrelerdir. Oosit, bu hücrelerle birlikte kültüre edilir (166, 168).

### ***İn vitro* matürasyon (IVM)**

Hastaların çok az veya hiç ovaryan stimülasyon almadığı durumlarda, toplanan immatür oositlerin *in vitro* koşullarda matürasyonlarını tamamlaması olayıdır. Bu yöntem sayesinde OHSS gibi hayatı tehdit eden komplikasyonların önüne geçilmiş olur. Özellikle PCOS'u olan hastalarda KOH protokolleri sonrası yüksek OHSS riski taşımaları nedeniyle, IVM tercih edilen bir yöntemdir. IVM sayesinde, KOH protokollerinin yüksek maliyeti ve yan etkilerinden kaçınılmış olunur (169).

## **2.2 Erkek Üreme Sistemi**

Erkek üreme sistemi; testisler, epididimis, duktus deferens gibi genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri (prostat, vezikula seminalis, bulboüretral bezler) ve penisten oluşur (170).

### **2.2.1 Dış genital organlar**

#### **Penis**

Radiks ve korpus olmak üzere başlıca iki kısımdan oluşur. Radiks penis, bulbus penis ve krus penis adı verilen iki bölümdür. Bulbus penisin içinden üretra geçer ve bu kısım korpus spongiosum penisin posteriyor bölümüdür. Krus penis, korpus kavernosum penisin posteriyorunda yer alan erektil dokudur. Korpus penis, iki korpus kavernosum ve bir korpus spongiosum penisten oluşur. Korpus spongiosumun genişlemiş uç kısmına glans penis adı verilir ve içinden üretra geçer. Glans penis, prepisyum adı verilen hareketli bir deri ile örtülüdür (170).

#### **Skrotum**

İçinde testisleri, epididimi bulunduran torba şeklinde bir yapıdır. Dıştan içe doğru altı tabakadan oluşur. Bunlar; Deri, tunika dartos, fascia spermatika eksterna, musculus cremaster, fascia spermatika interna ve tunika vaginalisdir (170).

### **2.2.2 İç genital organlar**

İç genitaler; testis, epididim, funikulus spermatikus, ductus deferens, prostat, glandula seminalis, glandula bulboüretalis ve ductus ejakulatorius'dan oluşur (170).

#### **Erkek üreme sisteminin embriyolojisi**

Embriyonun cinsiyeti, fertilizasyon esnasında belirlenmesine rağmen gonadal farklılaşma ancak 7. haftanın başında görülür. Erkek embriyonun genital ve üriner sistemi bir süre birlikte gelişim gösterir (171).

Embriyoda mezoderm üç tabakaya ayrılır. Bunlar paraksiyel mezoderm, ara mezoderm ve yan plak mezodermidir. Erkek ürogenital sistemi, ara mezodermden gelişir. Bir çift olan ara mezoderm sağlı sollu aşağıya doğru uzanırken, servikal nefrotom, mezonefroz ve metanefroz yapıları gelişir. Mezonefrozlardan üriner ve genital sistem gelişir. Hemen lateralinde kaudale doğru uzayan, mezonefrik kanallar (Wolff kanalları ) gelişir (172). İntrauterin 44 - 48. günlerde sölom mezoteli içeriye doğru katlanır, katlanan sölom epiteliinden bir çift paramezonefrik kanallar (Müller

kanalları) gelişir. Mezonefrik ve paramezonefrik kanallar, Wnt-4, Wnt-9b gibi sinyallerin etkisiyle kaudal yönde uzayıp ürogenital sinüse ulaşır. Ürogenital sinüse ulaştınca, içinde lümen oluşmaya başlar. Kranial uçta ise periton boşluğuna açılır. Epiplasttan köken alan primordiyal kök hücreleri 6. haftada vitellüs kesesi duvarından psödopotlarıyla amipsi hareketlerle arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca göç ederek gonadal kabaarıntıya ulaşırlar. Gonad taslaklarına ulaşan primordiyal germ hücreleri totipotent kök hücre özelliğindedir. Bazı genlerce indüklenen mezonefroz ve sölom epitel hücreleri somatik seks kordonlarını oluşturur. Seks kordonları erkek embriyoda sertoli hücresine, dişi embriyoda ise folikül hücrelerine dönüşür. Sertoli hücrelerince kuşatılan primordiyal germ hücrelerinin mitozu durur. Ancak sertoli hücrelerinin sentezlediği retinoik asit metabolize edici enzim nedeniyle mayoz bölünme gerçekleşmez. Postnatal 3. aydan sonra Tip A spermatogonyumlara dönüşür. Tip B spermatogoniumlar mayoz tekrar başladığında gelişir. Spermatogenez ise ancak pubertede gerçekleşir. Fenotipik cinsiyet, her zaman dişi yönde gelişme eğilimindedir. Dişi yönde gelişim için hormonal uyarıya ihtiyaç yoktur, spontan gerçekleşir. Ancak erkek yönünde gelişim için bazı genler ve hormonların varlığı şarttır (173).

Dişi ve erkek embriyonun genital yapıları, 6. haftanın sonuna kadar farklılaşmamış evre adı verilen yapıdadır ve birbirlerinden ayırt edilemezler. Yedinci haftadan itibaren farklılaşmaya başlar. Erkek ve dişide gen içeriği aynı olmasına karşın, hepsi aktif değildir. Bazı düzenleyici genlerin etkisiyle, bu genlerin bir kısmı erkekte, diğer bir kısmı da dişide aktifleşir. Y kromozomunun kısa kolunda bulunan testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli SRY geni aktive olunca, gonad farklılaşması başlamış olur. Bu genin aktivasyonu, erkek gonadının farklılaşması için şarttır. SRY geninin aktivasyonunun gerçekleşmediği durumlarda, SRY geninin varlığı gonadların erkek yönünde farklılaşmasını sağlayamaz. Yapılan araştırmalar sonucu X ve Y kromozomları olan seks kromozomlarının, otozomal kromozomlardan zaman içinde geliştiği görülmüştür. Rekombinasyon denilen gen alışveriş özelliğini yitiren X ve Y kromozomları birbirlerinden farklı özellik gösterirler (174). Y kromozomu üstündeki SRY geni tek başına etkili değildir. Ancak somatik kromozomlarda bulunan Sox 9 geni ile birlikte çalıştığında, etkin olabildiği görülmüştür. SRY geni hedefi olan somatik kromozomlarda bulunan Sox 9 geni ile etkileşir. SRY ve Sox 9

birlikte, X kromozomu üzerinde bulunan DAX1 genini inhibe ederken, 9. kromozomda bulunan DMRT genlerini aktive ederler. Sonuçta erkek yönünde farklılaşma başlar. Testis ve sertoli hücreleri gelişir (25, 175). Sertoli hücreleri testisin yüzey epitelinden gelişir ve salgıladığı müllerian inhibe edici faktörü (MIF), müllerian kanalın regrese olmasına neden olur. Sertoli hücreleri testis gelişimini düzenler. Testis kordonları, seminiferöz tübüller ve testis içi kanallar oluşur. Mezonefrik kanalların kaudalinden epididimis, testis dışı kanallar ve vezikulo seminalis gelişir. Testise göç eden mezenkim hücrelerinden leydig hücreleri gelişir. Androjen bağlayıcı protein salgırlarlar.

Sekizinci haftada androjenik hormonlar, testesteron ve androstenedione salgırlar. Daha sonra testesteron üretimini, insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu uyandır. Gelişimin ileri dönemlerinde ise testesteron salgısını hipofizdeki gonadotropinler düzenler. Leydig hücrelerinden salgılanan 5 $\alpha$ -redüktaz enziminin etkisiyle testesteron dihidrotestesteron (DHT)'a dönüşür. DHT etkisi ile üretra, prostat, penis ve skrotum gelişir. Ayrıca DHT, testislerin inguinal kanaldan geçerek skrotuma inişinde de etkilidir. Bu iniş 10-14. haftalar arasında gerçekleşir (172, 173).

Sonrasında fetal leydig hücreleri gerileyerek yok olur. Yerine yeni tip leydig hücreleri oluşur. Bu yeni tip hücrelerden salınan androjenler, erkek tipi davranışı oluşturur, sekonder seks karakterinin gelişmesini sağlar ve spermatogenezi başlatır. Bulboüretal bez endoderm kökenli üretranın spongiöz parçasından gelişir. Düz kas hücreleri ve stroması ise mezenkimden gelişir. Prostatın bez yapısı ise prostatik üretranın endodermal hücrelerinden gelişirken, düz kas hücreleri ve stroması mezenkimden gelişir (172, 173).

## **Testisler**

Skrotumun içinde yer alan bir çift yumurta şeklinde organdır. Spermatik kordonlarla abdominal duvara asılıdırlar. Vücut boşluğundan uzakta olması, vücut sıcaklığının 2-3°C altında bir sıcaklıkta olmalarını sağlar. Bu sıcaklık spermatogenez için şarttır. Testisler aorta abdominalisten çıkan arteria testikularis tarafından kanlanır. Arteriya testikularisin çevresinde, panpiniform venöz pleksusu bulunur. Arter ve ven arasında

zıt yönlü bir kan akımı vardır. Bu anatomik yerleşim ve zıt yönlü kan akımı sayesinde testis ısısı 2-3°C düşürülür (176).

Ayrıca kremasterika kasının kontraksiyonu veya gevşemesi ile testisler vücuda yaklaştırılıp uzaklaştırılarak testis soğutulur ve vücut sıcaklığının altında bir sıcaklıkta tutulurlar. Testisler, endokrin ve ekzokrin fonksiyona sahip organlardır. Erkek embriyonun normal gelişimi için testislerin ürettiği androjenlerin varlığı şarttır. Pubertede testislerin salgıladığı testesteron, sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur. Erişkin erkekte spermatogenez, testise ve salgıladığı hormonlara bağlıdır (176).

Testisler dıştan üç tabakalı kalın bir kapsülle sarılmıştır. Kapsülün tabakaları dıştan içe doğru sırasıyla: Tunika vajinalis: Testisler abdominal kaviteden skrotuma bu periton tabakası ile inerler. Mezotelle döşelidir. Tunika albuginea: Çok kalın bir fibroelastik bir sıkı bağ doku tabakasıdır. Arka yüzdeki alana mediastinum testis adı verilir ve testise giren çıkan vasküler yapılar sinirler, lenfatikler burada yer alır. Tunika vasküloza: En içte bulunan gevşek bağ dokusudur. Bol damar yapısı içerir (177). Kapsülden testise uzanan bağ dokusu septumları testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır. Her lobülde kıvrımlı birkaç tane seminifer tübül ve stromal bağ dokusu bulunur. Kıvrımlı tübüllerin uç kısmı düz olmaları nedeniyle tubulus rektus adını alır. Bu yapı mediastinumda rete testis olarak devam eder ve duktuli efferentes ile duktus epididimise bağlanır. Duktus epididimis, duktus deferense bağlanır. Duktus deferens, duktus ejakulatoryus olarak üretraya açılır (6). Testiste seminifer tübüller, fibroblastlar, lenf damarları, fenestralı kapiller ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu bulunur (176).

### *Seminifer tübüller*

Her iki testiste toplam 500-2000 seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller 150-250µm çapında ve 30-80cm uzunluğunda kıvrımlı tübüllerdir. Seminifer tübüller arasında intertisyel doku yeralır. Burada lenf ve kan damarları, leydig hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, mast hücreleri, peritübüler düz kas hücreleri ve büyüme faktörleri bulunur. Seminifer tübüllerin etrafı germinal veya spermatogenetik epitel ismi verilen bir epitelle çevrilidir. Bu epitel iki hücre tipi içerir. Bunlar, sertoli ve

spermatogenik seri hücreleridir. Seminifer tübülde aynı hücrenin ardışık ortaya çıkarak görülmesine seminifer tübül siklusu adı verilir. İnsanda her hücrenin siklus evreleri, ratlardan farklı olarak mozaik bir dağılım gösterir. Kesitlerde farklı sıklusa ait hücreler aynı anda görülebilir (176).

*Setoli hücreleri:* Spermatogenik seri hücreleri arasında bulunan prizmatik yapıdaki uzun destek hücreleridir. Her sertoli hücresi yaklaşık 30-50 arası spermatogenik seri hücrelerini besleyip destek olabilir. Çoğalabilme özellikleri yoktur. Bol mitokondriyon, lizozom, golgi kompleksi, aER ve granüler endoplazmik retikulum (gER) ve lipid damlacıkları içerirler. Üçgen, oval şekilli veya bazalde yassı şekilli ökromatik nükleusları ve belirgin nükleolusları vardır (177). Elektron mikroskopunda ayırt edilebilen, sitoplazmanın bazalinde Carcot-Bottcher adı verilen inklüzyon cisimciklerine sahiptirler. Bu kristallerin lipid transport görevi olduğuna inanılır (176). Ayrıca aralarındaki zonula okludens tipi sıkı bağlantı ile kan-testis bariyerini oluşturur. Kan-testis bariyeri, yan yana sertoli hücreleri arasındaki zonula okludens tipi bağlantılardır. Bu bariyer spermatogenik seri hücrelerini bağışık yanıtta ve antikorlardan korur. Endokrin ve ekzokrin fonksiyonları vardır. Testesteronu yüksek konsantrasyonda tutan androjen bağlayıcı protein (ABP) ve FSH'ı inhibe eden inhibini sentezler. Spermatogenez için gerekli mikroçevreyi oluşturur. Sertoli hücreleri, fetal dönemde AMH salgılar. Bu hormon erkek fetusde müllerian kanalların gerilemesine sebep olur. Ayrıca plazminojen aktivatörü, transferrini ve seruloplazmini de sentezler (176, 178).

*Spermatogenik seri hücreleri:* Primordiyal germ hücrelerinden kaynaklanan sürekli çoğalan germ hücreleridir. En inmatür yapıdaki spermatogonyumlar bazal laminaya oturmuştur. Matürasyonunu tamamladıkça lümene doğru hareket ederler. Spermatidler lümene yakın yer alır. Lümen içinde spermiyumlar bulunur. Olgun bir spermiyum oluşması yaklaşık 74 gün süren spermatogenez ve spermiyogenez olarak adlandırılan ardışık olaylar sonucu, seminifer tübüllerde pubertede gerçekleşir. Bu süre sabittir. Erkeklerde spermatogenez, ömür boyu devam eder. Spermin epididimden geçişi ise yaklaşık 2-4 hafta sürer. Tunika propriya adını alan tabaka, kollajen lif ve düz kas hücreleri içerir. Peritübüler düz kas hücrelerinin kasılmasıyla

spermatazoa genital boşaltım kanallarına aktarılır. Bu hücreler ayrıca büyüme faktörlerinin kaynağıdır (176, 178).

*Leydig hücreleri (interstisyel hücreler):* Seminifer tübüllerin arasında, interstisyel alanda bulunan büyük poligonal hücrelerdir. Testisin yaklaşık % 5-10'unu oluşturur. Leydig hücreleri lipofuksin, Reinke kristalleri, lipid damlacıkları ve bol aER içeren eozinofilik hücrelerdir. Reinke kristalleri, elektron mikroskopunda ayırt edilen tam olarak fonksiyonu bilinmemekle beraber hücre içinde üretilen salgının hücre dışına verilmesinde rol oynadığı düşünülen özelleşmiş yapılardır. Steroid bir hormon olan testesteronu salgırlar. Testesteron erkek embriyonun normal gelişiminde, pubertede sekonder seks karakterlerinin gelişiminde ve spermatogenezde rol oynar. Ayrıca testisin skrotum içine inişinde görev alan İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 3 (IGFBP-3) isimli bir peptid salgılar (176, 179).

### **Spermatogenez**

Testis içinde seminifer tübüllerde gerçekleşir. Sperm üretiminin birinci kısmı olan germ hücrelerinin farklılaşma sürecidir. İntrauterin hayatta erken embriyonik dönemde vitellüs kesesi duvarındaki mezoderimde bulunan primordiyal germ hücreleri, gonadlara göç ederek gonositleri oluşturur. İntrauterin 3-6 aylarda gonositler prolifiye olur. Gonosit proliferasyonunda bazı büyüme faktörleri, E2 ve A vitamini türevi olan retinoik asit rol oynar (180). İntrauterin 6. aydan sonra gonositler durağan bir döneme geçerler. Postnatal dönemde bu durağanlık biter ve mitoz bölünmelere tekrar başlarlar. Erkek gonad mayoz bölünmelerden kaçınır. Retinoik asit bu mayozları aktive ederken, p450 enzimi ve CYP26B1'i engellediği gösterilmiştir. Mayoz bölünmeler postnatal başlar ve puberte de LH'in etkisi sonucu testesteron, gonositlerden spermatogonyal kök hücrelerin proliferasyonunu başlatır. Erkek için spermatogenez hayat boyu devam eder (181).

Gonositler, seminifer tübülün medialinde bulunan büyük yuvarlak hücrelerdir. Podositlerle gonositler bazale doğru hareket eder. Bu esnada C-kit ekspresyonu görülür (182). Gonositlerden Tip A spermatogonyumlar oluşur. Tip A spermatogonyumlar ise seminifer tübül bazaline doğru yerleşmiş küçük hücrelerdir. İnsanda iki çeşit Tip A spermatogonyum bulunur. Bunlar; A koyu ve A açık tip

spermatogonyumlardır. Tip A koyular kök hücre rezervini oluştururken, Tip A açık olanlar ise spermatogonyumlara farklılanırlar. Tip A spermatogonyumlar, seminifer tübül epitelinin kök hücreleridir, zamanla bölünmeye devam ederek Tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Rutin H&E boyamalarda Tip A ve Tip B spermatogonyumlar ayırtedilebilir. Tip B spermatogonyumlar mitozla bölünerek primer spermatositleri oluştururlar. Kromozom sayılarını iki katına çıkarır ve 1. mayoz bölünmesini gerçekleştirerek sekonder spermatositi oluşturur. Bu olaylar yaklaşık 20-21 gün sürer. Sekonder spermatosit 2n kromozoma sahiptir ve yarı ömürleri çok kısadır. Hemen 2. mayoz bölünmeye giderler. 2. mayoz bölünmeden önce DNA replikasyonu ile kromozom sayısını iki katına çıkartmadığı için oluşan yavru hücreler (spermatidler) n yani haploid kromozoma sahip olacaktır. Mayoz bölünme sırasında gerçekleşen krossingover sayesinde oluşan tüm spermatositler birbirlerinden farklı genetik özelliktedirler. Bu nedenle, dolaşım sisteminden uzak tutularak erkeğin immün sisteminden korunmalıdırlar. Sertoli hücreleri arasındaki zonula okludens tipi sıkı bağlantılar sayesinde kan-testis bariyeri oluşturur ve yeni oluşan spermatositler erkeğin immün sisteminden korunmuş olur (175, 176).

### **Spermiyogenez**

Sperm gelişiminin ikinci aşamasıdır. Bu dönemde yuvarlak spermatidler morfolojik ve fonksiyonel olarak yeniden değişime uğrarlar. Bu olaya spermiyogenez adı verilir ve yaklaşık 35-45 gün sürer. Golgi, peryodik asit-schiff ile (PAS) pozitif boyanan çok sayıda granüller içerir. Bu granüller çekirdek zarı ile birleşerek akrozomal vezikülleri oluşturur. Bu veziküller sperm başının anteriyöründe yer alır. Sentriyol ise sperm başının posteriyöründe kuyruğu oluşturur. Kuyruk aksonem yapısındaki mikrotübüllerden oluşur. Akrozomal veziküller sperm başında kep yapısı oluşturur. Gelişmekte olan spermatid kuyruğunu lümene uzatır. Kromatinler yeniden düzenir. Genomun çoğu, protaminler tarafından sıkı paketlenir. Az bir kısmı histonlarla paketlenir. Nükleus ovalleşir ve anteriyorda yerleşir. Mitokondriyonlar boyun bölgesine göç eder. Kuyruk gelişimini tamamlar ve fazla sitoplazma rezidüel cisimcik olarak atılır. Spermiyasyon adı verilen bir süreçte spermatidler, sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene atılırlar (176, 178).

### **Matür spermin yapısı**

Olgun spermin boyu yaklaşık 60µm'dir. Sperm başı kaşık şeklinde ve ovaldir. Baş boyutları 4,5x3x1µm'dir. Baş kısmının anteriorunda akrozomal kep bulunur. Akrozomal kep hidroliz enzimleri içerir. Bu enzimler akrozomal reaksiyonla salınır ve oositin zona pellusidasını eriterek fertilizasyonu kolaylaştırır. Kuyruk dört kısımdan oluşur. Bunlar; boyun, orta parça, esas parça ve son parçadır. Boyun kısmı sentriyolleri, orta kısım hareket için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondriyonları, esas kısım kalın fiberleri ve aksonemi, son kısım ise sadece aksonemi içerir. Lümene bırakılan spermatazoalar önceleri hareketsizdirler. Peritübüler düz kas hücrelerinin kontraksiyonları ile lümeden düz tübüllere iletilirler. Burdan sırası ile rete testis, duktus efferentes ve duktus epididimise geçiş yaparlar. Duktus epididimise motilite özelliği kazanırlar. Motilite yeteneğinin kazanımında siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve Ca<sup>++</sup> iyonunun rolü vardır. Spermier bazı hücresele değışimle geçirirler. Nükleus DNA'sı olgunlaşır. Sitoplazma azalır. Akrozomal membranda değışiklikler sonucu dekapasitasyon faktörü içerirler. Dekapasitasyon faktörü ancak dişi üreme kanallarında uzaklaştırılarak spermier fertilizasyon yeteneği kazanabilirler. Bu olaya kapasitasyon adı verilir. Spermier erkek üreme kanallarında 2-3 hafta canlı kalabilirler (176,183). Matür bir sperm, gerekli metabolik aktivite ve vitaliteye sahip, motil, zona pellusidaya bağlanmasını sağlayan proteinlere ve akrozomal enzimlere sahip olmalıdır. Ayrıca fertilizasyon sonrası denkondasyon yeteneğine sahip, erkek pronükleus oluşturabilen bir kromozamada sahip olmalıdır (56).

### **Testis içi kanallar**

Sırasıyla tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentisdir. Tübül içindeki sıvı, spermier epididime iletirler. Duvarı başlangıç kısmında sadece sertoli hücreleriyle döşeli olan düz yapıdaki tubuli rektilerle testislere bağlanır. Rete testisler bağ dokusu içerir ve kübik epitel ile döşelidirler. Ortalama 20 duktuli efferentese bağlanırlar. Duktuli efferentesler, silyasız kübik ve silyalı prizmatik epitelile döşelidirler. Bu yalancı çok katlı prizmatik epitel tipi nedeniyle deniz kabuğu şeklinde görülrler. Sperm hücreleri, uzun hücrelerdeki silyaların süpürme hareketi ile testis içinden testis dışına epididimisin kanallarına doğru iletilmiş olur. Peritübüler düz kas hücrelerinin kontraksiyonu da spermier duktus epididimise iletilmesine yardımcı

olur. Kısa silyasız kübik hücrelerde bulunan mikrovilluslar sayesinde de seminifer tübüllerden salgılanan sıvının büyük bölümü geri emilmiş olur (176).

### **Testis dışı genital boşaltım kanalları**

Sperm ve içinde bulunduğu sıvıyı penise kadar taşıyan duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejakulatoryus'tan oluşur (176).

#### *Epididimis*

Testisin üst, arka bölümünde yer alan hilal şeklinde uzunluğu açıldığında yaklaşık 5m olan kıvrımlı kanallardır. Üç kısımdan oluşur. Bunlar baş, gövde ve kuyruktur. Duktus efferentes baş bölgesine girerken, duktus epididimis kuyruk bölgesinden çıkarak duktus deferense bağlanır. Spermier epididimideki kanallarda progresif motilite ve fertilizasyon yeteneklerini kazanırlar. Bu süre yaklaşık 2-4 hafta kadar sürer. Spermierin akrozom ve nükleusları yeniden şekillenir, plazma membranlarının fosfolipid ve kolesterol içeriği değişir. Akrozom olgunlaşmasını tamamlayan spermierin epididimis içindeki dekapasitasyon faktörleri sayesinde akrozomal aktiviteleri durur. Spermier dişi genital kanallarında bu dekapasitasyon faktörlerinin uzaklaştırılmasıyla tekrar fertilizasyon yeteneğini kazanmış olurlar. Bu olaya kapasitasyon adı verilir. Epididimin kanalı, yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşelidir. İki tip hücre içerir. Bunlar uzun sterosilyaları olan esas hücreler ve bazal hücre adını alan küçük kök hücrelerdir. Epididimin esas hücrelerinin sıvı absorpsiyonu, bazı glikolipid, glikoproteinlerin salgılanması, sertoli hücrelerinden kurtulmuş rezidüel cisimcik ve dejenere spermierin ortadan kaldırılması görevi vardır. Kanalların etrafında peritübüler düz kas hücreleri vardır. Bu düz kas hücreleri artar ve üç tabakalı bir hal alır. Düz kas tabakasının kontraksiyonu da spermierin duktus deferense geçişine yardımcı olur. Matür sperm oluşumu için epididimal mikro çevreye ihtiyaç vardır. Baş kısımdan kuyruğa doğru ilerlerken spermierin progresif motilite ve fertilizasyon yeteneği gittikçe artar. Ayrıca epididimisin sperm depolama işlevi de vardır. Özellikle kuyruk bölümünde spermierin büyük kısmı depolanır. Ancak bu depolanma süresi uzadıkça spermierin fertilizasyon ve motilite yeteneği azalır. Epididimal sperm olgunlaşması ısıdan etkilenmektedir. Optimum sıcaklık vücut sıcaklığından 2-3°C düşük olmalıdır (176, 183).

### *Duktus defferens (Vas deferens)*

Kalın duvarlı, dar bir lümene sahip düz bir kanaldır. İnguinal kanaldan geçerek abdomene girer. Prostat bezinin içinde genişlemiş uç kısmı ampulla duktus deferens adını alır ve vezikülo seminalisle birleşerek duktus ejakulatoryusu oluşturur. Ejekülatuar kanal prostatik üretraya açılır. Epiteli, duktus epididimise benzer şekilde uzun prizmatik hücreler ve küçük yuvarlak bazal hücreler içerir. Ancak kalın bir kas tabakasına sahip olması nedeniyle preparatlarda lümeni düzgün görülmez. Derin longitudinal katlantılar içerir (178).

### **Aksesuar bezler**

Bu bezler birer çift seminal bez, bulboüretal bez ve tek olan prostat bezidir. Semeni oluşturan salgıları üretirler (176).

### *Seminal bezler*

Bir kapsülle sarılı kıvrımlı kanallardan oluşur. Kanalin mukozası lümene doğru çok sayıda katlantı yapar. Kanal epiteli tek ya da yalancı çok katlı prizmatik hücrelerden oluşur. Bol salgı granülü içerir. Salgısı ekzokrin özelliktedir. Salgısı ejakülatın yaklaşık %70'ini oluşturur ve fibrinojen, furuktoz, basit şeker, amino asit ve prostaglandinden zengindir. Furuktoz sperm için enerji kaynağıdır. Fibrinojen ise koagülasyonu sağlar. Düz kas tabakasının kontraksiyonları ile bu salgısını ejakülatuvar kanala boşaltır (178).

### *Prostat bezi*

Mesanein hemen altında lokalize olan üretrayı çepeçevre saran bir bezdir. Boyutları 2x3x4cm 'dir. Ortalama 20gr ağırlığında bir bezdir. Ortalama 30-50 adet tübüloasiner bezden meydana gelmiştir. İçinden prostatik üretra geçer. Düz kas tabakasının kontraksiyonları ile kanal içerikleri prostatik üretraya boşalır. Bez yapısı üç tabakadır. Bu tabakalar içte mukoza, sonra submukoza ve en dışta periferik tabakadır. Periferde yer alan prostatik bezler alkali bir sıvı salgılar. Bu sıvı, glikoproteinleri, enzimleri, prostoglandinleri, fibrinolizini, prostata spesifik antijeni (PSA) ve prostatik asit fosfotazı (PAP) içerir. PSA'nın dolaşımında yüksek oranda

bulunmasının klinik önemi vardır. Prostat karsinomu veya iltihabını işaret eden bir tümör belirteçidir. PAP'ın ise hücre metabolizmasını düzenleme rolü vardır. Tübuloasiner bezler tek katlı veya yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşelidir. Bez lümeninde kalsifiye küçük taşlar bulunabilir. Bunlara korpora amilasea adı verilir. Prostat anatomik olarak dört bölüme ayrılır. Merkezi zon: Prostatik üretrayı çevreleyen en içteki kısımdır. Prostatın yaklaşık %25'ini oluşturur. Submukozal bezler burda yer alır. Periferik zon: Merkezin etrafındaki kısımdır. Prostatın yaklaşık % 70'ini oluşturur. Esas tübuloasiner bezleri içerir. Geçiş zonu: Prostatik üretrayı çevreleyen yaklaşık %5'lik kısımdır. Mukozal bezler burda yer alır. 4. Periüretal zon: Mukozal ve submukozal bezleri içeren kısımdır (176, 178).

#### *Bulboüretal bezler (Cowper bezleri)*

Bir çift küçük, yuvarlak, bezelye boyutunda tübuloasiner bez özelliğinde yapılarıdır. Kanalları tek katlı prizmatik epitelle döşelidir. Salgısı mukoid özellikte olup galaktoz, galaktozamin ve galakturonik asit içerir. Salgısını penil üretranın proksimaline boşaltır. Salgının mukoid özelliği sayesinde penil üretrayı kayganlaştırılarak sperm geçişi kolaylaştırır (176).

#### **Semen**

Sperm hücrelerini, testis içi kanallardan gelen salgıları, testis dışı kanallardan ve aksesuar bezlerden gelen salgıları içeren homojen, gri-beyaz renkli, özel kokulu, mukoid, alkali bir sıvıdır. Yarı katı koagüle halde ortalama 2–5ml hacimdedir. Semen içinde spermatozoa, su, prostaglandinler, C vitamini, inositol, kalsiyum, magnezyum, bakır, çinko, sülfür gibi elektrolitler bulunur (56, 96).

Geçmişten günümüze kadar erkek semen içeriği sabit kalmayarak değişime uğramış, sperm sayısı ve kalitesi belirgin olarak azalmıştır. Erkek üreme sisteminin, kimyasallar, alkol, sigara kullanımı, radyasyon, hava ve çevre kirliliği, iklimsel değişiklikler, teknolojik aletler, mesleksel faktörler, stres, yeme, içme, giyinme, uyku, sedanter yaşam gibi faktörlere karşı çok hassastır. Tüm bu çevresel faktörlerin olumsuz etkileri neticesinde günümüzde sperm kalite ve sayısının geçmişe oranla azaldığı, muhtemelen gelecekte de azalmaya devam edeceği söylenebilir (184).

## **Penis**

Arkada iki adet korpus kavernozum, önde bir adet korpus spongiyozum olmak üzere üç erektil yapı ve onları çevreleyen deriden oluşur. Korpus spongiozum penis distalde genişleyerek glans penisi oluturur. İçinden penil üretra geçer. Penil üretra yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Distalde çok katlı yassı epitele dönüşüp glans penisi kaplayan epidermisi oluşturur. Sadece glans penis, altındaki bağ dokuya sıkıca bağlıdır. Penisde subkutan yağ dokusu bulunmaz. Glans penis prepisyum adı verilen bir deri ile örtülüdür. Bu erektil yapılar içlerine helisin arterlerin uzandığı, parasempatik uyarı sonucu ereksiyon halinde içlerine kanın dolduğu kavernöz boşlukları barındırırlar. Korpus kavernozumların çevresindeki tunika albuginea adı verilen bağ doku yapısı ereksiyon durumunda venlere baskı yaparak venöz boşalmayı engeller ve sertliğin devam etmesini sağlar. Sempatik uyarı sonucu ejakülasyonun başlarında helisin arterler kasılır ve kavernöz boşluklara kan akışı azalır. Neticesinde tunika albugeniannın venöz doku üstüne yaptığı basınç azalır ve venöz geri dönüş sağlanmış olur. Erektile dokular sertliğini kaybeder (178).

## **2.3 Kadın Üreme Sistemi**

Kadın üreme sistemi dış ve iç genital organlar olmak üzere ikiye ayrılır.

### **2.3.1 Dış genital organlar**

Dış genital organların tamamı vulva adını alır. Vulva mons pubis, labia majör, labia minör, klitoris, himen, vestibul, Bartholin bezleri, forşet ve perineden oluşur (185).

### **Dış genital organların gelişimi**

Erkek ve dişi embriyolarda gelişimin 7. haftasına kadar dış genitalerin gelişimi aynıdır. Ancak bundan sonra farklılaşma başlar ve ayırt edilebilir hale gelir. Gelişimin 3. haftasında primitif çizgiden gelişen mezanşim hücreleri iki adet kloakal katlantı ve arasındaki kloakal membranı oluşturur. 4. haftada kloakal katlantılar kloakal membranın anteriorunda birleşerek genital tüberkülü, medialinde ürogenital katlantıları ve posteriorda anal katlantıyı oluşturur. Bu esnada ürogenital katlantıların lateralinde genital şişlikler gelişir (171). Östrojenin etkisi ile genital tüberkülden

klitoris, ürogenital katlantılardan labia minörler, genital şişliklerden labia majörler ve ürogenital oluktan da vestibul gelişir (172).

Tüm dış genital organlar bol miktarda serbest sinir sonlanmaları, meissner korpuskülleri, pacini korpuskülleri içerir ve çok katlı yassı epitelle örtülüdür. Mons pubis, keratinize çok katlı yassı epitelle kaplı subkutan adipoz dokudur ve kıl folikülleri içerir. Labia majörler, erkekteki skrotum derisinin kadındaki karşılığıdır. Mons pubis gibi keratinize çok katlı yassı epitelle kaplı subkutan adipoz dokudur. Mons pubisten posterior forsete doğru ürogenital açıklığın lateralinden uzanırlar. Dış kısımları kıl folikülü içerirken, iç kısımları içermez. Ter ve yağ bezleri içerirler (186). Labia minörler, vestibulumun lateralinde labia majörlerin medialinde kılsız deri katlantılarıdır. Anteriyorda klitorise kadar uzanırken, posterior tarafta birleşirler. Erkekten penis derisine karşılık gelir (186). Yağ dokusu ve kıl folikülü içermezler. Epitel hücreleri çok miktarda melanin pigmenti içerdiği için hafif koyu renklidir. Ayrıca bol miktarda elastik lif, sinir sonlanmaları ve damar yapısı içerir (162). Klitoris, erkekte penise karşılık gelen erektil özellikte bir dokudur. İki adet korpus kavernozum ve bir adet glans klitorisden meydana gelen bir yapıya sahiptir. Çok sayıda duyuşal sinir sonlanması içerir ve muköz bir membranla kaplıdır (186). Vajinal vestibül, labia minörler arasındaki açıklıktır. Orta kısmında introitus vajina ve himen bulunur. Çok katlı yassı epitelle kaplıdır. Epitel, Hart çizgisinin dışında keratinize, içinde ise nonkeratinize yapıdadır. Mukus salgılayan Bartholin bezleri ve paraüretral Skene bezlerini içerir (162).

### **2.3.2 İç genital organlar**

Kadın iç genital organları vajen, uterus, iki adet tuba uterina ve iki adet overden oluşur (185).

#### **İç genital organların gelişimi**

İntrauterin 5-6. haftada genital organlar farklılaşmamış haldedir. Her iki cinsiyette de iki çift genital kanal bulunmaktadır. Bunlar Mezonefrik kanallar (Wolff kanalı) ve Paramezonefrik kanallardır (Müllerian kanallar). Y kromozomunun yokluğunda paramezonefrik kanallar dışı üreme sistemini geliştirirken, mezonefrik kanallar 10-

16. haftalarda progresif olarak geriler ve embriyonik artık olarak kalırlar. Y kromozomunun varlığında ise testis gelişir. Testisdeki Sertoli hücreleri tarafından MİF salgılanır. MİF paramezonefrik kanalları inhibe ederken, mezonefrik kanallar gelişmeye devam eder (185). Paramezonefrik kanallar gonadlar ve mezonefrik kanalların lateralinde gelişmeye başlar. Kranial uçları periton boşluğuna açılır ve uçları açık kalır. Bu birleşmeyen uç kısımdan, tuba uterinalar gelişir. Kaudal uçları pelvik bölgeye kadar uzanır. Burda mezonefrik kanalları önden çaprazlar ve mediale doğru büyümeye devam ederek karşı taraf paramezonefrik kanalı ile orta hatta birleşir. Y şeklinde bir yapı oluşturur. Bu yapıya uterovajinal primordiyum adı verilir. Uterovajinal primordiyum ürogenital sinüs içinde, sinüs tüberkülü denilen çıkıntıyı oluşturur.

Zamanla kaudal uça kaynaşan paramezonefrik kanalların arasındaki septum yok olarak, tek bir uterin fundus, uterin korpus, serviks ve üst vajen gelmiş olur (171). Bu septumun sebat etmesi durumunda uterin septum, bikornis uterus adı verilen konjenital anomali görülür. Endometriyal stroma ve miyometriyum komşu mezankimden, tubal uterin ve servikal epitel ve paramezonefrik kanaldan gelişirken vajinanın fibromüsküler yapıları ise komşu mezankimden gelişir (172). Uterovajinal primordiyumun ürogenital sinüs içinde oluşturduğu sinüs tüberkülünden iki solid çıkıntı olan sinovajinal bulbuslar gelişir. Sinovajinal bulbuslar proliferate olup birbirleriyle birleşerek vajinal plağı oluştururlar. Daha sonra plağın sentral hücreleri parçalanarak 5. ayda tamamen kanalize olacak tüp şeklini alan vajinanın lümen kısmını oluştururken, periferal hücreleri de vajinanın epitelini oluşturur. Uterusun son kısmı olan istmusun etrafındaki kısım vajinal forniks olarak isimlendirilir. Vajinal forniksler paramezonefrik kanaldan köken alır. Yani vajenin üst bölümü uterus kanalından, alt bölümü ise ürogenital sinüsten gelişmiş olur (171). Vajen lümeni fetal hayatta ürogenital sinüsten himen adı verilen bir yapı ile ayrılmıştır. Himen genelde perinatal dönemde yırtılır ya da üzerinde çok çeşitli farklı şekil ve sayıda delikler bulunan ince bir müköz membran olarak devam eder (172).

## **Vajina**

Himenden başlayarak arkaya ve yukarıya doğru uterus serviksine kadar uzanan tüp şeklinde içte sirküler dışta longitudinal düz kas tabakası içeren fibromusküler bir organdır. Üst ucu uterin servikse uzanmış, alt ucu himenle ürogenital sinüsten ayrılmıştır (186). Vajen anteriyora göre posteriyorda daha yukarıdan servikse tutunduğu için posteriyor vajen duvarı anteriyora göre daha uzundur. Erişkin bir kadında anteriyor duvar uzunluğu ortalama 7cm, posteriyor duvar uzunluğu 9cm'dir. Serviksle vajen arasında forniks adı verilen üç boşluk yer alır. Bu boşluklar anterior, posterior ve lateral forniksler adını alır. Arka vajinal forniksin Douglas boşluğuna komşuluğu işlevsel olarak önemlidir. Cul-de-sac yöntemiyle posteriyor vajinadan peritoneal bölgeye kolayca ulaşılabilir (185). Vajen üç katmandan oluşur.

*Vajenin mukozası:* 150-200µm genişlikte nonkeratinize çok katlı skuamöz bir epitele sahiptir. Mukozada ruga adı verilen katlantılar vardır. Vajen mukozası östrojene duyarlıdır. Foliküler fazda östrojen varlığında mukoza epitel hücreleri yüzeye göç eder ve glikojen sentezleyip depolar. Mukoza laktobasillus içeren bir floraya sahiptir. Mukoza hücreleri dejenere olup deskuamasyona uğradığında, laktobasilluslar açığa çıkan glikojeni metabolize ederek vajinal pH'ı 3.5-4.5 arasında asidik özellikte tutarlar. Bu asidite sayesinde patojen mikroorganizmaların vajende kolonizasyonunun önüne geçilmiş olur. Doğal bir bariyer oluşur. Altındaki Lamina propriya'da epitel içine doğru uzanan bağ dokusu papillaları vardır. Ayrıca bol miktarda elastik lif, lenfosit ve nötrofil içerir. Müköz bez ve kıl folikülü içermez. Vajinin lumbrikasyonu çoğunlukla transludasyon yoluyla olur. Bartolin bezi ve servikal bezlerin salgıları da az da olsa katkıda bulunur (187).

*Vajenin Müsküler tabakası:* Ortada yer alan bu tabaka dışta longitudinal, içte sirküler düz kas liflerinden oluşur. Vajen güçlü bir kas tabakasına sahiptir. Vajinanın dışa açılan kısmında M. Bulbospongiosus'un çizgili kas lifleri yer alır (162).

*Vajenin Adventisyası:* İçte sıkı bağ dokusu, dışta gevşek bağ dokusu yapısındadır. İç tabaka vajinaya elastikiyet özelliği kazandıran çok sayıda elastik lif içerir. Dış tabaka ise çok sayıda vasküler yapı, lenfatik ve sinirleri içerir (187).

## Uterus

Pelvis de mesane ile rektum arasında, bulunan içi boş ve ampül şeklinde bir organdır. Duvarları kalın düz kas tabakası olan fundus, korpus, isthmus, serviks olmak üzere dört kısımdan oluşur: Fundus: Tuba uterinaların açıldığı yerin üst kısmında kalan yuvarlak bölümdür. Korpus: Ön yüzü düz, arkası konveks özellikte gövde bölümüdür. İstmus: Alt kısımda daralan bölümdür. Serviks: En altta bulunan yüzük şeklinde vajinanın üst kısmını saran bölümdür (6). Ağırlığı ve boyutları, geçirilen doğum sayısı ve östrojen maruziyeti ile değişir. Nullipar kadında ortalama 7x5x2,5cm boyutlarda ve 30-40 gr ağırlığındadır. Uterus duvarı üç tabakadan oluşur. Bu tabakalar içten dışa doğru; endometriyum, miyometriyum ve perimetriyumdur (185).

*Endometriyum:* Titrek tüylü tek katlı prizmatik epitelle döşeli olan uterusun mukoza tabakasıdır. Lamina propriyası tip 3 kollajen lifleri, fibroblastları ve ara maddeyi içerir. Epitel tabakası çok sayıda tübüler bezleri döşeyen salgı hücresi içerir. Miyometriyumla arasında submukoza tabakası yoktur. Endometriyumun iki bölgesi vardır: Bazal tabaka (stratum basale); bol hücre içeren bir Lamina propria ve uterin bezlerin son kısımları bulunan miyometriyuma yakın olarak derinde yerleşen bölgedir. İşlevsel olan yüzeyel tabaka (stratum fonksiyonale); işlevsel tabaka her menstrual siklus sırasında proliferere ve dejenere olur. Ancak bazal tabaka nispeden değişmeden kalarak, fonksiyonel tabakanın rejenerasyonu sağlar (187).

Puberte sonrasında menapoza kadar olan dönemde hipofiz ve ovaryum hormonlarının değişen seviyeleri, kadın genital sisteminde bir takım siklik değişikliklere neden olur. Bunlardan en aşikar olanı tabii ki menstrual sikluskteki endometriyumun siklik değişiklikleridir. Üreme çağında endometriyum her ay kendini embriyo implantasyonu ve gelişimi için hazırlar. Endometriyumdaki bu siklik değişiklikler, ovaryum folikül gelişimi ile paralellik gösterir. Her ay siklus sonunda, işlevsel tabakanın dökülmesi ve mukozal damarların kanamasına menstruasyon kanaması adı verilir. Endometriyumun damarları, her siklusda sırası ile proliferasyon ve dejenerasyon gösterir. Endometriyumun damar ağı çok farklı özelliktedir. Uterin arterin dalları olan arkuat arterler miyometriyumun ortalarında bulunur ve endometriyuma uzanan iki tip arter dalı verirler. Bunlar, bazal tabakayı

besleyen düz arterler ve daha yüzeye doğru uzanarak fonksiyonel tabakayı besleyen spiral arterlerdir. Spiral arterlerden çıkan arteriyoller kapiller ağ yapısını oluşturur. Kapiller ağ yapısı laküna adı verilen boşluklar içerir. Venöz sistem bu lakünaları direne ederek boşaltır. Spiral arterlerin uçları düz arterlerin aksine her siklusta östrojen ve progesterondan etkilenecek dejenereasyona ve rejenerasyona uğrar. Östrojen ve progesteron hormonları tüm dişi üreme sistemini her yaşta etkiler. Puberte ve menapoz arasındaki reprodüktif dönemde hormonlarda oluşan siklik değişiklikler, endometriyumda da siklik değişiklikler oluşmasına neden olur. Bu ardışık fazlar, proliferasyon fazı, sekretuar faz ve menstrual fazdır. Menstrual siklusun fazları esnasında endometriyumun kalınlığı 1mm-6mm arasında değişir. Menstrual siklus ortalama 28 gün sürer. Menstrual döngünün ilk günü menstruasyon kanamasının olduğu ilk gün olarak kabul edilir (162).

*Proliferasyon fazı:* Ovaryum foliküllerinin olgunlaşması ile eş zamanlı gerçekleşir. Ortalama 8-10 gün sürer. Bu süre sabit değildir. Değişken olabilir. Östrojen tarafından düzenlenir. Bu nedenle foliküler veya östrojenik evreolarak adlandırılır. Bir grup folikül hızla büyür ve foliküldeki teka interna hücreleri östrojen sentezler. Östrojen, teka eksterna hücrelerinin bağlantılı olduğu vasküler yapılar ile kan dolaşımına geçer. Plazma östrojen konsantrasyonu artınca menstruasyon sonrası 0,5-1 mm kalınlığa kadar incelmış olan endometriyumun bazal tabakası östrojenin etkisiyle proliferasyona başlar. Artık proliferasyon fazı başlamıştır. Stratum bazaledeki bezlerin epitel hücreleri çoğalır, göç eder ve yeni tek katlı prizmatik epitel dokuyu oluşturur. Epitel hücrelerinin bazalinde glikojen birikimi görülür. Uterus bezleri dar ve düz tüpler halindedir. Stromal hücreleri proliferasyona başlar ve ara madde salgılar. Endometriyumun fonksiyonel tabakası tekrar oluşur. Bu esnada spiral arterler uzar. Proliferasyon fazı 28 günlük siklusun yaklaşık 14. gününde gerçekleşen ovulasyonun bir gün sonrasına kadar devam eder ve bu esnada endometriyumun kalınlığı artık 2-3 mm'dir (162).

*Sekretuar faz:* Korpus luteumda progesteronun salgılanması ile başlar. Progesteronun etkisi nedeniyle sekretuar veya luteal evreolarak da adlandırılır. Yaklaşık 14 gün sürer. Progesteronun etkisi ile uterus bezlerinin epitel hücreleri çoğalır, büyür, kıvrımlı hal alır. Glikojen sentezler ve depolarlar. Büyüme mitoz bölünme ile değil,

epitel hücrelerinin hipertrofisi ile gerçekleşir. Artan vaskülarite nedeniyle endometriyumun ödemlenerek kalınlığı 5-6mm 'ye kadar çıkar. Spiral arterler daha da uzar, kıvrımlı bir hal alır ve yüzeye kadar uzanır. Eğer ovulasyon sonucu fertilizasyon gerçekleşirse embriyo uterin kaviteye yaklaşık 5. günde ulaşır. Birkaç gün uterin kavite içinde uterin sıvıda yüzer. Bu esnada endometriyumun kalınlığı, yapısı ve uterin salgılar embriyonun implantasyonu ve beslenmesi için en uygun halindedir. Aynı zamanda progesteron, miyometriyum kontraksiyonlarını engelleyerek implantasyonu kolaylaştırır. Embriyonun implantasyonu sonucu endometriyum stromal hücreleri, östrojen ve progesteronun etkisiyle büyük soluk, glikojenden zengin desidual hücrelere farklılaşır (162).

*Menstrual faz:* Menstrual siklusun ilk günü kanamanın görüldüğü 1. gündür. Menstrual dönem ortalama 3-5 gün sürer ve bu süre sabit değildir. Her menstrual fazda yaklaşık 35-50 ml kan kaybedilir. Bu dönemde endometriyum yaklaşık olarak en ince hali olan 0,5-1mm kalınlıktadır. Eğer fertilizasyon ve blastosist implantasyonu olmazsa, korpus luteum 10. günün sonunda aktif olarak hormon üretmez. Östrojen ve progesteronun plazma seviyesi düşer. Bu ani düşüş ile endometriyumda bazı değişiklikler görülür. Progesteron azalınca spiral arterler kasılır ve stratum fonksiyona tabakasında iskemi gelişir. İskemiye bağlı olarak hücrel hipoksi gelişir. Hipoksik hasar sonucu hücreler bazı sitokinler salgırlar. Bu sitokinler lökosit kemotaksisine neden olur. Lökositler kollajenaz ve metalloproteinazları serbestleştirir. Bu maddelerin etkisi ile epitel özelliğini yitirir ve vasküler yapılarda rüptür meydana gelir. Progesterona duyarlı olmayan düz arterler ve stratum bazale tabakası bu hormonal düşüşten etkilenmez. Sadece stratum bazale kalana kadar dökülme devam eder. Menstrual akıntı, uterin sıvılar, stratum fonksiyonaleden dökülen stromal ve epitelyal hücreler, spiral arterlerin rüptüre olması ve damar dışına çıkan kandan oluşur. Bu döngü her ay sürekli tekrar eder. Kanamanın durması ile yeni siklus hazırlığı için ovaryum foliküllerinin gelişmesi ve epitel hücrelerinin proliferasyonu başlar (162).

Proliferasyon evresinde endometriyumun epitel örtüsü tekrar oluşur, uterus bezleri dar boş tüpler halindedir, spiral arterler uzar. Proliferasyon dönemi ortalama 8-10 gün sürer. Menstruasyonun 14. gününde ovulasyon gerçekleşir ve daha sonra korpus

luteumdan salgılanan progesteronun etkisiyle 14 gün süren sekretuar evre (progesterojenik-luteal evre) başlar. Sekretuar evrede epitel hücreleri glikojen sentezler ve depolar, bezler kıvrımlı hale gelir. Endometriyum, artık ödemli, en kalın ve embriyonun implantasyonu için en uygun haldedir (162).

*Miyometriyum:* Kalın bir düz kas tabakasıdır. Düz kas lifleri, karışık demetler halinde tuba uterina, vajen ve uterus ligamentlerine uzanır. Kalınlığı ve boyutu çok değişken olabilir. Gebelikte düz kas hücreleri hipertrofi ve hiperplaziye uğrar. Kollajen üretimi artar. Gebelik sonrası apoptozisle neredeyse eski haline geri döner (185).

*Perimetriyum:* En dıştaki bağ dokusu tabakasıdır. Uterusun anterior yüzünün küçük bir kısmı ve posterior yüzünün tamamı mezotelle çevrili seroza veya visseral peritonla kaplıdır. Anterior yüzün geriye kalan kısmı ise adventisya ile kaplıdır (187).

Bu üç tabakalı (endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum) yapı, fallop tüplerinde de aynı şekilde devam eder (187).

### **Serviks**

Serviks uterin istmusun kaudalinden başlar, alt kısımda vajeni çevreler ve ortalama 2 cm boyunda yuvarlak şekilde sirküler bir yapıdır. Düz kas ve fibröz dokudan oluşur. Düz kas lifleri, uterin ligamentler ve vajinanın duvarı ile birleşme yerleridir. Serviks, histolojik olarak uterusun diğer bölümlerinden farklı olarak, spiraller içermez. Bu nedenle menstrual sıklusdan etkilenerek dökülerek atılmaz. Serviksin içinde bir kanal vardır. Bu kanal her iki uçta, iki açıklıkla intrauterin boşluğa ve vajene açılır. Bunlar sırası ile iç ağız (internal servikal os) ve dış ağız (eksternal servikal os) ismini alır. Endoservikal mukoza 2-3 mm kalınlıktadır. Büyük dallı mukus salgılayan servikal bezleri içeren prizmatik (kolumnar) epitelle döşelidir. Bu bezlerden salgılanan mukusun özelliği her sıklusta progesteronun etkisi ile özellik değiştirmesidir. Sıklusun ortasında mukus miktarı artar ve daha az visköz bir hal alıp sperm geçişine müsaade ederken, sıklusun luteal fazında viskozitesi artarak bir tıkaç görevi görür ve sperm geçişini engeller. Gebelik esnasında servikal bezlerin sayısı ve salgıladıkları

mukusun viskozitesi, bir plak oluşturacak kadar yoğunlaşır. Bu plak sayesinde fetus asendan enfeksiyonlardan korunmuş olur. Serviksin vajene doğru çıkıntı yapan bölgesi ektoserviks adını alır ve aynı vajina gibi çok katlı nonkeratinize yassı epitel ile döşelidir. Ektoserviksin çok katlı nonkeratinize yassı epitel ile endoserviksin tek katlı prizmatik epitel arasındaki bölge transformasyon zonu ya da diğer adı ile skuamokolumnar bileşke ismini alır. Bu bölge geçiş bölgesidir. Reprodüktif çağda, eksternal osun dışında yer alırken, prepubertal dönem ve postmenapozal dönemde ise endoservikal kanalın içinde yer alır. Bu bölge, vajinal asidik pH ile sürekli temas halinde olması nedeniyle hücre hasarı ve dolayısı ile metaplaziye yatkındır. Metaplazik alandan intraepitelyal neoplazilerin sık gelişmesi nedeniyle bu bölge klinik öneme sahiptir (187).

### **Tuba uterina (Fallop tüpleri)**

Periton boşluğu içinde uterusdan ovaryumlara uzanan 10-12 cm uzunluğunda bir çift tüp yapısındaki organdır. Ovulasyonla periton boşluğuna atılan ovumu yakalayıp fertilizasyonun gerçekleştiği ampulla bölgesine taşır. Daha sonra oluşan zigotun morula evresine kadar gelişimi için gerekli ortamı sağlayarak uterin kaviteye iletir. Dört bölümden oluşur: İnfundibulum: Fimbria adı verilen parmaklı çıkıntıları içeren, ovulasyonla periton boşluğuna atılan oositi uterusu iletmek üzere yakalayan bölgedir. Ampulla: Fertilizasyonun gerçekleştiği tüpün en geniş bölgesidir. İstmus: Uterusa yakın olan dar bölgedir. İntramural (İnterstisyel) kısım: Uterus duvarı içindeki yaklaşık 1cm kadar olan en kısa bölgedir (187).

Tuba uterina'ların duvarı uterusu yaklaştıkça kalınlaşırken, lümeni daralır. Duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşur. Bu tabakalar, seroza, Tunika muskularis ve mukozadır. Submukoza içermez. Tunika mukoza: Tek katlı prizmatik epitel ve altındaki gevşek bağ dokusu yapısındaki lamina propriyadan oluşur. Pilika adı verilen mukoza katlantıları içerir. Bu katlantılar en çok ampulla bölgesindedir. Diğer bölgelerde giderek azalarak, intramural bölgede görülmez. Epitel hücreleri iki tiptir. Bunlar titretilmiş tüylü hücreler (kinosilyumlu tek katlı prizmatik hücreler) ve salgı yapan peg hücreleridir. Peg hücrelerinin salgıları, oosit ve sperm besler. Ayrıca sperm oositi dölleyebilme yeteneği kazanması için gerekli olan kapasitasyon faktörlerini içerir. Östrojenin aktif olduğu foliküller fazda bu titretilmiş tüylü hücreler büyür, uzar

ve uterusu doğru tek yönlü süpürme hareketi yapar. Bu dönemde salgı yapan peg hücreleri de hipertrofiye uğrayarak salgı miktarları artar. Luteal dönemde ise atrofiye uğrarlar. Lamina propriya tabakası vasküler yapılar, lenf damarları, sinirler ve bol miktarda retiküler lif içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır (162). Tunika muskularis: İçte sirküler, dışta ince longitudinal düz kas lifleri içeren bir tabakadır. Tunika serosa: Mezotelle döşeli visseral peritondan oluşan bir tabakadır (6).

### **Ovaryumlar**

Waldeyer'in ovaryan fossası adı verilen intra abdominal boşlukta bulunan bir çift oval ve yuvarlak şekilli organdır. Boyutları yaşa göre değişkenlik göstermelerine rağmen yaklaşık 5x3x3cm'dir. Üstten, alttan ve hilus bölgesinden mezovaryum ile uterus ligamentlerine tutunmuştur. Hem ekzokrin (oogenez) hem de endokrin (steroidogenez) salgı yapma özelliğine sahiptir (185).

### **Overlerin embriyolojisi**

Kromozomal cinsiyet X seks kromozomuna sahip oositin, X veya Y seks kromozomuna sahip sperm hücresi ile döllenmesi sonucu fertilizasyon esnasında belirlenir. Ancak intrauterin gelişimin 7. haftasına kadar dişi ve erkek embriyoların genital sisteminin gelişimi birbirine benzerdir ve morfolojik olarak ayırt edilemez. Bu nedenle bu döneme seksüel gelişimin farklanmamış safhası ismi verilir (172).

Gonadlar 3 kaynaktan farklılanırlar. Bunlar; mezotel, mezankimal doku, primordial germ hücreleridir (172).

Gonadlar ilk olarak 5. intrauterin haftada mezonefrozun medilinde gonadal kabarıntı veya gonadal sırt olarak görülürler. Bu esnada primordial germ hücreleri içermezler (171). Daha sonra gonadal kordonlar, alttaki mezankimin içine parmak şeklinde uzanırlar. Farklılanmamış gonad dışta korteks, içte medulladan oluşan ikili bir yapı halindedir. Embriyo XX seks kromozomu taşıyorsa farklılanmamış gonadın korteksi overe diferansiye olurken, medullası regrese olur. Embriyo XY seks kromozomu farklılanmamış gonadın korteksi regrese olurken, medullası testise diferansiye olur. Epiplasttan köken alan primordial germ hücreleri, primitif çizgi yönünde 3. haftadan sonra yaklaşık 24. günde umbilikal kese duvarına, endoderm hücreleri arasına göç

eder. Embriyonun katlanması sonucu bu kısım, embriyonun içinde kalırken, intrauterin 4. haftada primordial germ hücreleri artık gonadal kabarıntıya göç etmeye başlar ve 6. haftada gonadal kordonlara ulaşırlar. Gonadal kordonlara ulaştıklarında gonadal gelişmeyi indüklerler. 7. haftaya kadar her iki cinsiyette de gonadlar birbirine benzer özellikte, farklılanmamış haldedir. Y kromozomunun kısa kolunda yer alan SRY geni tarafından düzenlenen TDF, gonadın testiküler farklılaşmasını sağlar. Testesteron ve AMH 7. haftada erkek cinsiyetinin gelişimine neden olur. Y kromozomunun yokluğu ve XX kromozomunun varlığında gonadın overiyen farklılaşması gerçekleşir. Erkek cinsiyetin gelişmesinde hormonlar ve genler aktif rol oynarken, dişi cinsiyetin gelişiminde ise hormonların rolü yoktur. Tamamen pasif olarak gerçekleşir. Oluşan gonad doğrultusunda embriyonun dış genitaleri de şekillenmeye başlar (172).

Overler ancak 12. hafta histolojik olarak ayırt edilebilirler. Yüzey epiteli proliferiyeye olur ve 7. haftada sekonder kortikal kordonları oluşturur. 3. ayın sonunda bu kordonlar gruplar halinde ayrılır ve proliferiyeye olarak etrafları ovaryumun yüzey epitelinden gelişen yassı foliküler epitel hücreleriyle sarılır. Kortikal kordonlar mezenkim içine invaze olurken, 16. haftada primordial germ hücreleri de içlerine girerek primordial folikülleri oluşturur. Bu primordial foliküller prenatal dönemde mitozla çoğalırlar. İntrauterin 5. aya kadar bu mitoz çoğalma devam eder. Daha sonra ölmeye başlarlar. Böylece primer oosit ve oogonyumların sayıları gittikçe azalır (6). Yeni doğan döneminde primordial foliküller görülür. Postnatal dönemde ise yeni oogonyumlar artık oluşmaz. Medullar kordonlar ise regrese olur (172). İntrauterin hayatta overler arka abdominal duvar boyunca aşağı doğru inerek inguinal kanaldan geçmeden, pelvisin iki tarafına sağlı sollu yerleşirler (171).

### **Folikülogenez**

Primordial folikülden olgun graaft folikül aşamasına kadar olan tüm folikül gelişim basamaklarını içerir. Bu dönemde oosit çapı, folikül hücreleri ve bağ dokuda değişiklikler meydana gelir. İntrauterin 7. ayda oogonyumların bir kısmı 1. Mayoz bölünmeye girer ve bunlara artık primer oosit adı verilir. Ancak 1. Mayoz bölünmeyi tamamlamazlar. 1. Mayozun profazının diploten evresinde 10–50 yıl kadar beklerler (6). Pubertede her menstrual siklusta, bir oosit olgunlaşarak ovulasyonla atılır.

Bekleyen oosit ovulasyonla atılmadan hemen öncesinde 1. Mayoz bölünmesini tamamlar. Böylece oositin kromozom sayısı yarıya inmiş olur. Sitoplazmanın çoğu sekonder oositte kalırken, az bir kısmı ise 1. polar cisimcik (1.PB) adını alan yavru hücreye aktarılır. Daha sonra 1. polar cisimcik dejenere olup, ortadan kalkar. Sekonder oosit, 2. Mayoz bölünmeye girererek metafaz safhasında duraksar. Ancak fertilizasyon gerçekleşirse 2. Mayoz bölünmesini tamamlar. Kromozom sayısını 2. polar cisimciğe (2.PB) aktararak yarıya indirir. Daha sonra 2.PB dejenere olup ortadan kalkar (6).

### **Ovaryum Histolojisi**

Overler en dışta yer yer tek katlı yassı veya kübik hücrelerden oluşmuş germinal epitel ile hemen altında bulunan tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokusu yapısında bir kapsül ile çevrilidir. Birbirinden net bir sınırla ayırt edilemeyen dışta korteks, içte medulla olarak adlandırılan iki bölümden oluşur. Kortekste foliküller, düz kas lifleri ve bağ dokusu bulunurken, içte ki medulla bölgesinde ise organa giren çıkan kan ve lenf damarları, sinirler ve overleri mezoovaryum ile uterus ligamentlerine bağlayan bağ dokusu bulunur (187). Puberte öncesi kortekste sadece primordiyal foliküller görülürken, puberte sonrası hipofizer hormonların etkisi ile primer, sekonder, tersiyer foliküller, ayrıca foliküllerden gelişen korpus luteum ve korpus albicans ile atretik foliküller de görülür. Bu atretik foliküller ise makrofajlarca ortadan kaldırılır (188).

#### *Ovaryum folikülleri*

Her folikül bazal lamina ve bir ya da birkaç epitel hücresi ile sarılmış oositten oluşur. Gelişimlerine göre üç çeşit folikül tanımlanır. Bunlar primordiyal, gelişmekte olan (primer, sekonder) ve olgun (tersiyer ) foliküldür (188).

*Primordiyal folikül:* İntrauterin 3. ayda Tunika albugenianın altındaki kortekste görülürler. Gelişimleri hipofiz hormonlarından bağımsızdır. Tek katlı yassı epitel hücrelerince çevrilmiş primer oositten oluşur. En dışta bazal laminası bulunur. Primer oosit 1. Mayoz bölünmesine başlamış, ancak bölünmeyi tamamlamamış yani henüz matür değildir. Yaklaşık 30µm çapındadır. Bir veya daha çok nükleoluslu,

periferik yerleşimli büyük nükleuslu hücrelerdir. Belirgin ve bol golgi kopleksi, endoplazmik retikulum, mitokondriyon, lizozom ve annüler lameller içerir. Ayrıca ooplazmasında, endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, mitokondriyon, lizozomların membranlarının ve veziküllerin kümelenmelerinin oluşturduğu bir yapı olan Balbiani cisimcikleri bulunur (162).

*Primer folikül (Preantral):* Primordiyal folikülün yassı hücreleri gelişerek kübik veya prizmatik hücrelere dönüşür. Oositin çapı yaklaşık 50-80µm'a ulaşmıştır. Artık glikozaminoglikan ve glikoproteinleri salgırlar. Oosit ve folikül hücreleri arasında PAS pozitif boyanan bir yapı izlenir. Bu yapıya zona pellusida ismi verilir. Zona pellusida ZP-1, ZP-2, ZP-3 glikoproteinlerinden oluşur. Bunlardan ZP-3 glikoproteini spermatozoa bağlanma reseptörü içermesi nedeniyle akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesinde rol oynar. Tek katlı epitel hücreleri içeren foliküllere unilaminar primer folikül denirken, çok katlı epitel hücreleri içeren foliküllere ise multilaminar primer folikül denir. Bu çok katlı yapıya artık stratum granulozum, folikül hücrelerine de granuloza hücreleri adı verilir. Folikül hücreleri ve oosit arasında besin alışverişini sağlayan gap junctionlar bulunur. Çok katlı epitel içeren granuloza hücreleri arasında, daha çok gap junctionlar bulunur. Gap junctionlar oositin matürasyonunun inhibisyonuna neden olan oosit matürasyon inhibitörü (OMI), folikül gelişimini uyarıcı kemik morfogenetik proteini (BMP), büyüme-farklılaşma faktörleri (GDFs) gibi faktörlerin geçişine olanak verir. FSH, bu bağlantılardan geçerek granuloza hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak östrojen sentezi ve dolayısı ile folikül gelişimini uyarır. Bu esnada oositin etrafındaki bağ dokusunda bazı değişiklikler olur. Çevredeki stromal hücreler farklılanarak teka folikülü adı verilen sıkı bir bağ dokusu kılıfı oluşturur. Daha sonra teka folikülü iki tabakaya farklılanır. İçteki tabaka teka interna adını alır ve vasküler yapılardan zengindir. Bu vasküler yapılar folikülün büyümesi ve beslenmesini yardımcı eder. Ayrıca teka interna hücreleri, LH reseptörleri içerir. Bu reseptörlerin uyarılması sonucu östrojen prekürsörü olan androjenleri sentezlerler. Androjen granuloza hücrelerinde FSH etkisiyle östrojene dönüşür. Tekrar geri teka internaya dönen östrojen vasküler yapılarla kan dolaşımına geçerek vücuda dağılır. Dıştaki tabaka ise teka eksterna adını alır. Düz kas hücrelerinden ve kollajen liflerden zengindir. Oosit büyümeye ve gelişmeye devam ederken korteksin derinlerine doğru yer değiştirir,

gittikçe medullaya yaklaşır. Oosit gelişiminde FSH, çeşitli büyüme faktörleri, Ca<sup>++</sup> iyonu ve anjiogenez rol oynar. Balbianni cisimciğinden ayrılan golgi kopleksi tüm ooplazmaya yayılır. Böylece organel sayıları artar. Kortikal granüller adı verilen salgı vezikülleri görülür. Bu kortikal granüller oosit spermle karşılaştığında içeriği olan proteazları salgırlar. Oosit ve çevresindeki granüloza hücreleri arasında perivitellin aralık bulunur. Granüloza hücrelerinin oosite doğru uzanan uzantıları ile oositen perivitellin aralığa doğru uzanan çok sayıda mikrovillusları temas halindedir. Bu yapılar plazma membranına kadar uzanır. Oosit ve granüloza hücreleri arasındaki bu ikili etkileşim sayesinde oosit büyümesini, matürasyonunu ve gelişimini sağlar (162).

*Sekonder folikül (Antral):* Multilaminar primer folikülün granüloza hücreleri 6-12 hücre tabakasına ulaştığında, hücreler arasında granuloza hücrelerinin oluşturduğu sıvı dolu boşluklar meydana gelir. Bu boşluklar birleşerek antrum adı verilen hilal şeklinde bir kavite oluşturur. Artık bu aşamadaki folikül sekonder folikül adını alır. Antrumdaki folikül sıvısı, hyaluronik asitten zengindir. Folikül sıvısı, folikül gelişiminin ilk dönemlerinde granüloza hücrelerince sentezlenirken, daha sonra plazmadan hyaluronik asitin su tutmasıyla artar. Oosit büyümesi granüloza hücrelerinin foliküler sıvıya salgıladığı OMI tarafından durdurulur. Ancak folikül büyümeye devam eder (6, 188).

*Graaft folikül (Tersiyer, olgun):* Folikül büyümeye, antrum genişlemeye devam ederek yaklaşık 10mm çapa ulaşır. Oosit etrafındaki granüloza hücreleri kümülüs ooforus adı verilen bir tümsek oluşturur. Oositi çevreleyen granüloza hücrelerine artık korona radiata adı verilir. Granüloza hücreleri arasındaki intersellüler alanda hyaluronik asit ve proteoglikan içeren PAS pozitif boyanan Call-Exner cisimcikleri görülür. Boyutu 6cm ulaşan folikül, ovaryum yüzeyine doğru bombeleşir ve ovulasyon için hazırlanır. Granüloza hücrelerinden salgılanan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücre proliferasyonunu ve vasküler geçirgenliği artırarak hangi folikülün ovulasyona gideceğini belirler. Diğerlerine göre daha çok vasküler ağa yani gonadotropine sahip foliküller ovulasyonla atılır. Antrumun boyutu artarken, stratum granulozum tabakası gittikçe inceliklenir. Oosit ve etrafındaki kümülüs hücreleri ile diğer granüloza hücreleri arası bağlantılar gevşeyerek ovulasyona

hazırlanır. Teka interna hücreleri lipid damlacıkları biriktirerek steroid hormon sentezlerler. LH, bu hücreleri uyararak androjen sentezletir. Androjen FSH etkisi ile granüloza hücrelerinde östrojene dönüşür ve tekrar teka interna tabakasına taşınarak vasküler yapılarla kan dolaşımına katılır. Östrojen, folikül granüloza hücrelerinin büyümesini uyarır. Ovulasyondan 24 saat önce LH seviyesindeki ani artışa cevap olarak granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri desensitize olur ve artık östrojen sentezleyemezler. Ani LH artışından 24 saat sonra primer oosit 1. Mayoz bölünmesini tamamlar ve sekonder oositi oluşturur. Luteinize olan granüloza hücreleri ve teka hücreleri progesteron sentezlerler (162, 188).

### **Ovulasyon**

Sekonder oositin, graaft folikülden ayrılarak intra abdominal boşluğa atılması olayıdır. Yaklaşık olarak menstrual siklusun ortasında yani 14. günde gerçekleşir. LH etkisi ile granüloza hücreleri daha çok prostoglandin ve daha çok hyaluronik asit üreterek folikül sıvısının miktarını, vizkositesini, basıncını artırarak graaft folikülün ovaryum yüzeyine bombeleştiği yerde kan akımını bozarak beyazımtrak iskemik bir alan oluşturur. Bu alana stigma adı verilir. Bu alandaki kapillerlerden sızan plazminojen, kollajen liflerini eritir ve ovaryum duvarı gittikçe incilir. Foliküler sıvıdaki prostaglandinler, düz kas hücrelerinin kontraksiyonunu başlatır. Kontraksiyon neticesinde stigma yırtılır ve oosit etrafındaki kümülüs hücreleri ile birlikte ovulasyonla atılmış olur. Menstrual siklus başında, FSH etkisi ile yaklaşık 20 primer folikül uyarılır. Sadece bir bazen iki oosit gelişimine devam ederek kümülüs hücreleriyle birlikte intra abdominal boşluğa bırakılır. Oosit ovulasyondan hemen önce, profazında duraksadığı 1. Mayoz bölünmeyi tamamlar ve sekonder oosit haline dönüşür. 1. kutup cisimciği ile kromozom sayısını yarıya indirir. Ardından 2. mayoz bölünmeyi tamamlamayıp 2. mayozun metafazında duraksar. İna abdominal boşluğa bırakılan oosit tubal fimbriyalarca yakalanarak tuba uterinalara taşınır. Burda 24 saat canlılığını koruyan oosit bir spermatazoa tarafından fertilize olursa 2. Mayoz bölünmeyi tamamlar ve 2. kutup cisimciğini atarak kromozom sayısını tekrar yarıya indirir. Fertilize olan oosite artık zigot adı verilir. Zigot gelişimine devam eder. Eğer oosit, bu bekleyişi esnasında bir spermle karşılaşamaz ve fertilize olamazsa özelliğini yitirir ve dejenere olur (188).

Ovulasyondan sonra geriye kalan antruma kan dolar ve bu yapı korpus hemorajikum adını alır. Folikülün granüloza ve teka interna hücreleri LH etkisi ile değişime uğrar ve korpus luteuma dönüşür. Korpus luteum, steroid yapıda hormon sentezler. Korpus luteumda granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri bulunur. Granüloza lutein hücreleri soluk boyanan büyük nükleuslu, bol agranüler endoplazmik retikulum, mitokontriyon ve lipid damlaları içeren hücrelerdir ve progesteron sentezlerler. Teka lutein hücreleri ise daha küçük heterokromatik nükleuslu hücrelerdir ve östrojen sentezlerler. Bu hormonlar endometriyumu implantasyon için hazırlar. Fertilizasyon gerçekleşmezse korpus luteum ovulasyondan 10 gün sonra dejenere olarak apopitoza gider. Menstrual korpus luteumu adını alır. Korpus luteum, fibroblastlar tarafından sıkı bağ dokusu yapısında beyaz skar dokusu olan korpus albikansa dönüştürülür. Progesteronun yokluğunda endometriyumun yüzeyel tabakası dökülür. Buna menstruasyon denir. Fertilizasyon gerçekleşirse sinsityotrofoblastlarca aktivitesi LH'a benzeyen hCG adı verilen bir glikoprotein üretilir. hCG'nin etkisiyle korpus luteum gebelik korpus luteumu adını alır ve devamlılık gösterir. Gebeliğin 4. ayına kadar progesteron ve östrojen sentezlemeye devam eder. Dördüncü aydan sonra progesteron ve östrojen sentezleme işlevini plasentaya devrederek, büyük beyaz renkte bir korpus albikansa dönüşür (6, 162).

*Atrezi:* Fetal hayatta 15-18. haftalarda yaklaşık olarak 5-7 milyon oosit bulunurken, postnatal dönemde geriye yaklaşık 1-2 milyon oosit kalır. Yani çoğu atreziye uğrar. Bu atrezi devam eder. Reprodüktif çağda bir kadında geriye yaklaşık 300.000 - 400.000 oosit kalır. Primordiyal foliküllerin büyük bir kısmı embriyonik dönemde, postnatal dönemde ve puberte sonrası atraziye uğradığından giderek azalırken, yerini bağ dokusuna bırakır.

Kadınlar da erkeklerden farklı olarak oositlerin yeniden ve tekrar tekrar üretilmesi de söz konusu değildir. Menapozda oosit sayısı 1000'den daha az olacak şekilde azalmıştır. Her siklusda, bir çok folikül gelişmeye başlasa da yalnız bir veya bazen iki oosit ovulasyonla atılır. Yani bir kadın yaklaşık olarak 35-45 yıllık reprodüktif dönemi boyunca 450-500 oositi, overlerden ovulasyonla atar. Geriye kalan oositler ise atreziye uğrayarak dejenere olur. Yapılan son çalışmalarda atrazi de bazı genlerin rol aldığı görülmüştür (6, 162). Atrazi bazı ardışık olaylar serisidir. Bunlar sırasıyla;

Önce granüloza hücrelerinin mitozu durur. Hidrolitik enzimlerle apoptoz başlar. Granüloza tabakasına nötrofil ve makrofaj gibi hücreler gelir. Granüloza tabakasına vasküler yapılar içeren bağ dokusu invaze olur. Granüloza hücreleri antral boşluğa dökülür. Folikül kollabe olur. Teka interna hücreleri hipertrofiye uğrar. Bağ dokusu tüm folikül antrumunu kaplar (187).

### **Fertilizasyon ve kapasitasyon**

Kapasitasyon, matür spermatozoaların dişi üreme sistemi içinde uğradığı fonksiyonel ve yapısal değişikliklerdir. Bu sayede spermatozoalar fertilizasyon yeteneği kazanırlar. Ortalama 7 saat süren bu süreç sonrası spermatozoalarda hiperaktivasyon görülür. Spermatozoaların kuyruklarına ani  $Ca^{++}$  girişi sayesinde kamçı hareketi ile sıçrayabilirler. Oositin, zona pellusida tabakasına tutunabilirler. Kapasitasyona uğrayan spermatozoaların plazma membranında bazı değişiklikler meydana gelir. Adenilat siklaz aktivitesi ve cAMP miktarı artar. Tirozin fosforilasyonu artar.  $Ca^{++}$  kanal aktivasyonu ve hücre içi  $Ca^{++}$  miktarı artar. Zona pellusidaya bağlanmayı engelleyen spermatozoaların baş kısmındaki dekapasitasyon faktörleri ortadan kaldırılır. Sonuçta membranın yeniden modifikasyonu gerçekleşir (6, 187).

Dişi üreme sistemine giren 300 milyon spermatozoanın, sadece 300-500 tanesi fertilizasyonun gerçekleştiği tubaların ampulla bölgesine ulaşabilmektedir. Çok büyük bir kısmı daha girişte, vajende rugalar arasında takılır ve ölür. Çok az bir kısmı servikal mukusu geçerek uterin kaviteye ve uterin tüplere ulaşabilir. Oosite ulaşan spermatozoalar öncelikle oositin etrafındaki korona radiata tabakasını geçmek zorundadırlar. Kapasitasyonunu tamamlayan spermatozoalar bunu baş kısımlarındaki hyaluronidaz enzimi sayesinde başarırlar. Sadece bir spermatozoa zona pellusida bulunan ZP-3 reseptörlerine bağlanarak, akrozom reaksiyonunu başlatabilir. Böylece hücreye  $Ca^{++}$  ve  $Na^{+}$  girerken,  $H^{+}$  iyonu çıkar. Bu durum ooplazmanın pH'nın artmasına, akrozom membranı ve hücre membranının kaynaşarak akrozom içeriği olan enzimlerin salınmasına neden olur. Salınan enzimler zona pellusidayı eritir ve sadece tek bir spermatozoa tam olarak zona pellusidayı delip içeri girmiş olur. Oositin o spermi neye göre kabul ettiği hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu esnada membran potansiyeli -70 mV'dan +10 mV'a yükselir. Bu sayede oosit 2. Mayoz

bölünmeyi tamamlar, sekonder oosit matürasyonunu tamamlamış olur. 2. kutup cisimciği perivitellin aralığa atılır. 2.PB'nin varlığı matürasyon göstergesidir. Kortikal reaksiyon gerçekleşir. Kortikal granüllerden salgılanan enzimler ZP-3 reseptörlerini ortadan kaldırır. Bu olaya zonal reaksiyon adı verilir. Perivitellin aralığa girmeyi başaran spermatozoanın başının lateral membranı ile oosit membranı birleşerek kaynaşır. Sperm başı ve orta parçanın tamamı, kuyruğun ise sadece içeriği olan kinosilyumu oosit içine girer. Plazma membranı dışarda kalır. Spermatozoanın plazma membranı oolemma ile kaynaşır ve 23 paternal kromozom içeren erkek pronükleus oluşur. Erkek ve dişi pronükleusların birleşmesi sonucu 2n yani diploid kromozoma sahip zigot meydana gelir. Spermatozodan gelen oosit akdive edici faktörler sayesinde oksitativ metabolizması artan oosit, erken embriyogeneze hazırlanmış olur. Zigot, hızlı mitozlarla yarıklanmaya ve bölünmeye devam ederek embriyonik gelişimini sürdürür (6, 162).

### **İmplantasyon**

12-16 blastomerden oluşan embriyoya morula adı verilir. Morula fertilizasyondan sonraki 4.-5. günde uterin kaviteye ulaşır. Morulayı oluşturan hücrelere blastomer adı verilir ve zona pellusida ile çevrilidir. İçinde blastosel adı verilen bir boşluk ve etrafındaki blastosellerden oluşan embriyo blastokist (blastosist) adını alır. Blastokist uterin kavitede yaklaşık bir iki gün serbest halde yüzer. Bu esnada blastomer sayısı hızla artar. Periferal yerleşimli blastomerler trofoblast (dış hücre kitlesi), merkezi yerleşimli blastomerler ise embriyoblast (iç hücre kitlesi) adını alır. Zona gittikçe incelerek, yok olur. Önceleri tek katlı olan trofoblast hücreleri çok katlı bir yapı oluştururlar ve 6. günde endometriyumun epitel hücrelerine tuturlar. Daha sonra stromaya invaze olmaya başlar. Blastokist 11. günde tamamen endometriyuma gömülmüş haldedir. İmplantasyon, implantasyon penceresi denilen bir süreçte gerçekleşmektedir. Bu esnada uterus blastokist implantasyonu için reseptif (alıcı)'tir. Bu dönem kısadır ve progesteron, östrojenin endometriyuma olan etkisi ile gerçekleşir (6, 161, 162).

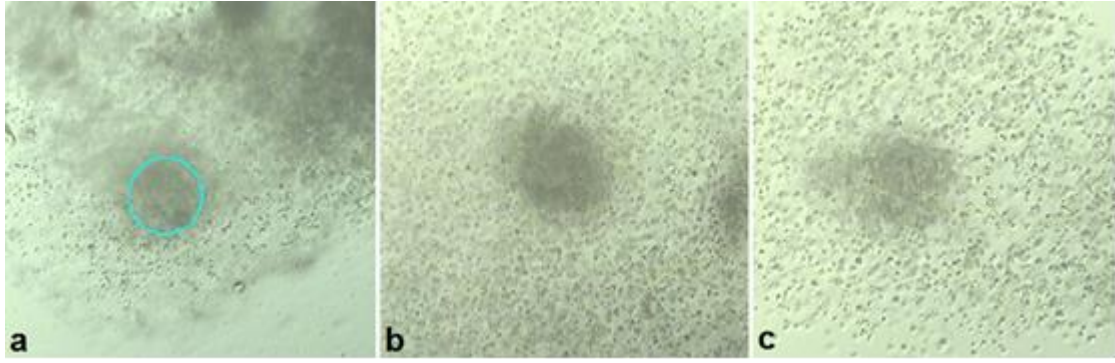
Trofoblastlar implantasyon sonrası sitotrofoblastlar ve sinsityotrofoblastlar adını alan iki tip hücreye farklılanırlar. İçte bulunan sitotrofoblastlar mitotik aktiviteye sahiptir. hCG ve steroid yapılı hormonları sentezler. Embriyoya immün tolerans sağlamak ve

red reaksiyonu engellemek için antiinflamatuvar sitokinleri sentezlerler. Sinsityotrofoblastlar ise sitotrofoblastlardan gelişen mitoz yeteneğine sahip olmayan çok nükleuslu, belirgin golgi kompleksi, yaygın aER ve gER, bol mitokondriyon ve lipid damlacıkları içeren hücrelerdir. Bu iki hücre tabakası birlikte plasentanın primer villuslarını oluşturur. Daha sonra bağ dokusu içeren sekonder villuslar gelişir. Vasküler yapıların da eklenmesiyle tersiyer villuslar gelişir. Plasentanın görevi, sadece gazların, besinlerin ve atıkların alınıp verilmesini sağlamak değil aynı zamanda endokrin bir organ olarak hCG, östrojen, progesteron, laktojen, relaksin gibi hormonların ve çeşitli büyüme faktörlerinin sentezlenmesini sağlamaktır. İç hücre kitlesini oluşturan embriyoblast hücreleri ise vitellüs kesesi ve amniyon boşluğu etrafında yeniden organize olur. Bu yapı bilaminer embriyonik disk adını alır. Vitellüs kesesine komşu hücreler hipoplast, amniyon boşluğuna komşu olan hücreler ise epiplast adını alır. Tüm embriyonik yapılar bu diskten gelişir. İmplantasyon sonrası endometriyum stromal hücreleri değişir ve desidual hücreler adını alırlar. Endometriyum da artık desidua olarak adlandırılır (6).

#### **2.4 Granüloza ve Kümüls Hücreleri**

Gelişen folikülün, foliküler hücrelerinin mitotik aktivitesi arttıkça çok katlı bir yapı oluştururlar. Artık foliküler hücreler, granüloza hücresi adını alırlar. Oositin etrafındaki bağ dokuda da bir takım değişiklikler meydana gelir. Bağ doku dış kısmında teka eksterna hücreleri, iç kısımda teka interna hücrelerinden meydana gelen ikili bir yapıya farklılanır. Teka interna hücreleri, bir bazal membranla granüloza hücrelerinden ayrılmıştır ve steroid yapıda hormon sentezi görevini yerine getirir. Teka interna hücrelerinden salgıladıkları testosteron hormonu granüloza hücrelerince östrojene dönüştürülür ve teka eksternadaki kapillerler vasıtası ile dolaşıma salınır. Olgun folikül, oosit ve etrafında farklılaşmış somatik hücreler içerir. Granüloza hücreleri, folikül duvarını döşeyen granüloza hücreleri (GC) ve oositi çevreleyen kümülüs hücreleri (CC) olarak iki tiptir. CC, oosit etrafındaki zona pellusida ile gap junction adı verilen bağlantılarla ilişki halindedir. CC bu bağlantılar sayesinde oositin içine aminoasitler, nükleotidler, metabolitler ve birçok molekülün giriş çıkışını sağlar (189, 190).

Oosit ve etrafındaki CC'ne COC adı verilir (Şekil 4). CC, zona pellusidanın üst kısmında prizmatik bir yapıya dönüşür ve korona radiata adını alır. Ovulasyon esnasında CC, korona radiata hücreleri ve folikül sıvısı oositle birlikte atılır. Tuba uterina'nın fibriyaları tarafından yakalanarak, fertilizasyonun gerçekleşeceği tubal kanal içine alınır (162, 191).



**Şekil 4.** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden alınmış COC'ye ait fotomikrograf örnekleri izlenmektedir (X10). a'da mavi halka ile işaretli alan oositi işaret etmektedir.

#### **2.4.1 Granüloza ve kümülüs hücrelerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerine etkisi**

CC, oosit büyümesinde rol alır. Tüm memelilerde oositler, etraflarındaki somatik hücrelerle karşılıklı bir ilişki içinde büyür ve gelişim gösterir. Somatik hücreler, mayotik duraksamada oositin beslenmesini ve daha sonra matürasyonunu sağlar (191, 192). Oosit ve CC arasındaki bu ilişki çift yönlüdür ve CC'nin uzantıları ile oositin zona pellusidası arasındaki gap junction adı verilen bağlantılar sayesinde gerçekleşir (193,194). GC ve CC, oositin gelişimi ve büyümesini sağlarken, oositin salgılanan bazı faktörler de folikülün büyümesi ve GC'nin farklılaşmasını sağlar (195-197).

*În vivo* ortamda COC gelişiminin olmadığı durumlarda implantasyon gerçekleşmediği görülür (198). *În vitro* ortamda, oositin CC'nin birlikte kültürünün embriyo morfolojisini ve blastosist oluşumunu iyileştirdiğini gösteren çalışmalar da vardır (15, 16).

CC ile embriyonun ko-kültürüne edildiği ve CC eklenerek embriyo transferi (ET) yapılan hastalarla ilgili yapılan bir çalışmada implantasyon, gebelik ve çoğul gebelik

oranları, yapılmayanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. *In vitro* fertilizasyon sonrası CC ile kültürlenmiş embriyoların bulunduğu petri kaplarındaki CC'nin dendrit benzeri yapılar geliştirerek petri kabında embriyo etrafında yayıldığı ve embriyoyu kuşattığı görülmüştür. Bu bulgular CC'nin salgıladıkları büyüme faktörleri ve sitokinlerin embriyonun implantasyonunu kolaylaştırdığını düşündürmüştür. CC sadece oosit ve embriyo gelişiminde rol oynamadığını bunun yanında implantasyon ve gebelik başarısını da artırdığını göstermiştir (15).

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda 2009 yılında yapılan bir uzmanlık tezi çalışmasında ICSI uygulanan hastaların bir kısmı otolog CC ile kültürlenerek, embriyolar yine CC ile birlikte transfer edilirken, diğer gruba ise rutin ICSI işlemi uygulanmıştır. CC ile kültüre edilen ve CC ile ET yapılan grupta fertilizasyon oranı ve klivaj oranı (% 44.37 -% 56.63 p= 0.030), (% 41.4 -% 59.6 p=0.001) anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur (199).

Ayrıca bu iki çalışmada benzer şekilde, kültür petri kablalarında bulunan CC'nin embriyolar etrafında kolonize olduğu, dendritik uzantıları ile ağ benzeri bir yapı geliştirerek embriyoyu çepeçevre kuşattığı görülmüştür. Bu yapının embriyonun endometriyuma adhezyon ve implantasyonunu kolaylaştırmada rol alabileceğine varılmıştır (15, 199).

Yine kardeş oositler üzerinde Mizuno ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada, grup A'da OPU'dan hemen sonra CC denude edilirken, grup B'de OPU'dan 120 dakika sonra denudasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra matürasyonunu tamamlayan tüm M2 oositlerle ICSI yöntemi uygulanmış ve embriyolar blastosist gelişimine kadar kültüre edilerek takip edilmiştir. Fertilizasyon, embriyo kalitesi, blastosist aşamasına ulaşma, implantasyon, gebelik, canlı doğum, abortus oranları açısından gruplar karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında fertilizasyon, blastosist, implantasyon, gebelik, canlı doğum ve abortus oranları açısından anlamlı bir fark bulunamazken, iyi kalite blastosist oranı CC ile kültürlenerek denudasyon işlemi OPU'dan 120 saat sonra ICSI işlemi öncesinde yapılan grupta, CC hemen OPU sonrası denude edilerek karşılaştırılan gruptan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlar ışığında oositlerin CC ile uzun süre kültüre edilmesinin embriyo kalitesi ve gelişimine olumlu etkisinin olduğunu ileri sürmüşlerdir (11).

Sığırlarda yapılmış başka bir çalışmada ise CC ile oositin ko-kültüre edilmesinin fertilizasyon ve bölünmeyi etkilemezken, embriyo gelişimi ve blastosist oranlarını artırdığı gösterilmiştir (12).

Yukarıda bahsettiğimiz gibi CC'nin oosit etrafında uzun süre kalmasının ART sonuçlarını iyileştirdiğini savunan çalışmalar olduğu gibi, bu sürenin uzamasının apoptozu indüklediği ve serbest oksijen radikali oluşumuna sebebiyet vererek embriyoyu olumsuz etkilediğini savunan çalışmalarda vardır (200-204).

CC ile inkübe edilen oositlerde matürasyon, embriyo kalitesi ve implantasyon oranlarının düşük olduğunu gösteren bir diğer çalışma da Vanderhyden ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Sonuçlar yine CC'den açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ile ilişkilendirilmiştir (205).

Konvansiyonel IVF yöntemi kullanılarak spermler ile inkübe edilen kardeş oositlerin yarısının CC'nin 3 ve 4 saat sonra erken denude edilerek ayıklandığı, diğer yarısının ise spermler ile inkübe edildikten 20 saat sonra geç denude edildiği iki benzer çalışmada normal fertilizasyon, kaliteli embriyo sayısı, gebelik, canlı doğum oranları karşılaştırılmıştır. Her iki çalışmada da CC erken ayıklanan gruplarda polispermi ve 3PN daha çok görülmüştür. Her iki çalışmada da benzer şekilde CC'nin 3. ve 4. saatte erken soyulmasının mekanik stres nedeniyle oositin zona pellusidasının zarar görmesine ve dolayısı ile polispermi, 3PN görülmesine neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Bunun yanısıra her iki çalışmada normal fertilizasyon, implantasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarında farklılık görülmemiştir (206, 207).

Denudasyon işleminin en ideal olarak ne zaman yapılması gerektiği ile ilgili birçok çalışma yapılmış, ancak henüz otörler arasında bir görüşbirliğine varılamamıştır (9, 208-211).

Birçok memeli türünde CC'nin ko-kültürünün emriyo kalitesi ve fertilizasyon oranlarını artırdığı bilinmektedir (205, 212-220).

CC'nin embriyonik gelişim üzerine etkileri hala tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte CC'den salgılanan faktörlerin oositin sitoplazmik matürasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir (221, 222).

CC yüzeyindeki sitoplazmik uzantıları aracılığıyla oosit ile etkileşime girerek ooplazma içine çeşitli molekül ve hormonların geçişini sağlar. Granüloza tarafından salgılanan bu moleküllerin oosit matürasyonunda etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (194, 223-227).

Oositin nükleer matürasyonu tamamlanırken sitoplazmik matürasyonunun tamamlanamaması embriyonun gelişimini olumsuz etkiler (219). Başarılı bir implantasyon ve iyi kaliteli embriyo gelişimi için oositin hem sitoplazmik hem de nükleer matürasyonu tamamlanmış olması beklenir (228, 229).

Oosit etrafındaki CC'nin salgıladığı büyüme faktörleri ve sitokinlerin sitoplazmik matürasyonda etkin rol aldığını gösteren birçok çalışma vardır (208, 210).

Kültür medyumları *in vivo* ortamı taklit etmeye çalışarak oosit matürasyonu ve embriyo gelişimine yardımcı olmayı hedefler. Geçmişten günümüze iyileştirilmeye çalışılan bu ortamların en ideal olacak şekilde geliştirebilmek için halen çalışmalar devam etmektedir. Kültür ortamlarına embriyonun ihtiyaç duyacağı sitokinler, büyüme faktörleri, besinler, hormon gibi birçok molekül eklenmiştir. Bu moleküllerin etki edeceği reseptörler genellikle oositin yüzeyinde bulunur. Bu nedenle oosit ve embriyoyu CC ile kültüre etmek oosit matürasyonu ve embriyo gelişimi için çok önemlidir (230, 231).

ICSI yönteminin, konvansiyonel IVF yöntemine en büyük üstünlüğü fertilizasyon oranlarının daha yüksek olmasıdır. Fertilizasyon başarısızlığının ICSI yönteminde çok daha düşük olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (17, 232-237).

Yapılan çalışmalar normal morfolojiye sahip spermelerde, normal genom oranının % 55'i geçmediğini göstermektedir (238). Bu nedenle ICSI yönteminde uygulandığı gibi embriyologların spermelerin morfolojik özellikleri ve hareket kabiliyetlerine bakarak seçim yapmalarının, en iyi fertilizasyon kapasitesine sahip spermeleri bulmak için en ideal yöntem olmadığı aşıkardır. Konvansiyonel IVF yönteminin en iyi spermi CC sayesinde seçebilmesi, ICSI yöntemine göre en önemli üstünlüğüdür. ICSI de böyle bir seçim şansı yoktur. Normal şartlarda spontan fertilizasyon yeteneği olmayan spermelerle bile ICSI yöntemi ile oosit döllenebilmektedir. Yakın zamanda

yapılan bir çalışma, *in vivo* koşullardaki gibi normal fizyolojiyi taklit ederek en iyi spermlerin COC tarafından seçilmesinin, IVF başarısı açısından daha ideal bir yöntem olduğu gösterilmiştir (13).

İyi kalite embriyo gelişmesi açısından, iki yöntemin birbirine bir üstünlüğü olmadığını, iyi kalitede embriyo gelişiminin daha çok sperm ve oositin kendi kalitesi ve iç dinamiklerine bağlı olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi, blastosis aşamasına ulaşma oranlarının konvansiyonel IVF yönteminde ICSI yöntemine kıyasla yüksek olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (18, 239-241).

İdeal spermi CC'nin seçmesinin, daha fizyolojik ve başarılı olduğu görülmektedir. CC, ayrıca salgıladıkları birçok faktör ve molekül sayesinde oosit matürasyonunu uyarabilme ve iyi kalite embriyo gelişimini destekleyebilme yeteneğine sahiptir. Konvansiyonel IVF'in başarısı tüm bu nedenlere bağlanabilir (242-246).

Konvansiyonel IVF ve ICSI yönteminin 177 hastada kıyaslandığı toplamda 3006 kardeş oositle yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre ICSI yöntemi uygulanan grubun fertilizasyon oranları konvansiyonel IVF uygulanan gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (% 67,1- % 43,6  $p < 0,001$ ) (239).

ICSI ve konvansiyonel IVF arasında bir önemli farklılık da embriyo fertilizasyonu, ilk bölünme ve 2 blastomerden 4 blastomerli embriyoya geçiş zamanının ICSI yönteminde birçok basamak atlandığı için yaklaşık olarak konvansiyonel IVF'a kıyasla 2-4 saat daha erken olmasıdır. Bu nedenle embriyo gelişimi bu zamanlamaya dikkat edilerek değerlendirilmelidir (247).

ICSI yönteminin implantasyon başarısızlığı oranları diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha düşüktür (17, 232-237).

Konvansiyonel IVF yöntemi uygulandıktan sonra fertilizasyonun gözlenmediği oositlere kurtarma ICSI yöntemi yapılması ve uygun hastalara ilk seçenerek olarak ICSI yöntemi yapılmasına rağmen, implantasyon başarısızlığı ART en büyük problemlerinden biri olmaya devam etmektedir. Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneğinin 2011 yılında bildirdiği verilere göre, fresh embriyo transferi (ET)

gebelik oranı (donör olmayanlarda) % 33, donmuş embriyo transferi (DET) gebelik oranı ise %21'dir (248).

1996 yılında Birleşik Krallık Dölllenme ve Embriyoloji Kurumunun veri tabanından alınan IVF siklusları verilerine göre transfer edilen 49.572 embriyodan sadece 5.676 (% 11,4) tanesi implante olabilmektedir. Bu doktorlar, hastalar, ülke ekonomisi açısından büyük bir maddi, manevi kayıp, stres, zaman, emek ve embriyo israfıdır (249).

İmplantasyon başarısını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar anne yaşı, gamet kalitesi, erkek faktörü, gelişen embriyo kalitesi, endometrial reseptivite, ET tekniği ve tecrübesidir. Anne yaşı en önemlilerinden birisidir. Anne yaşı arttıkça implantasyon başarısı azalır. Bunun nedeni kromozomal anomali sıklığının kadın yaşının artmasına paralel olarak artmasıdır (250, 251).

Yaşı 35'den küçük kadınlardan elde edilen 6 bin embriyo üzerinde yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre en iyi morfolojik özelliklere sahip embriyolarda bile anöploidi oranının %30 veya % 56 olduğu gösterilmiştir (252-254). Bu oran hasta yaşı arttıkça artmaktadır. 41 yaşından büyük kadınlarda anöploidi oranı % 80 - 90'lara çıkmaktadır (253-255).

Günümüze kadar ART'de yapılan tüm çalışmaların asıl amacı implantasyon başarısını artırarak eve sağlıklı bebek götürme oranlarını yükseltmektir. Bu amaçla yola çıkan bilim insanları ve doktorlar hastalarına en uygun tedavi yöntemini uygulamayı, en iyi embriyoyu *in vitro* koşullarda geliştirebilmeyi ve en iyi implantasyon potansiyeli olan embriyoyu transfer için seçebilmeyi hedeflemiştir. Bunun için birçok yöntem üstünde çalışmışlardır. İkinci ve üçüncü günündeki embriyo morfolojisine dayanarak en iyi ve en yüksek implantasyon potansiyeline sahip ideal embriyonun öngörülebilmesi zordur (256-259).

Embriyo kültür ortamlarının gelişmesi sayesinde, artık embriyolar *in vitro* ortamda blastosist aşamasına kadar geliştirilebilmektedir. Fizyolojik olan *in vivo* şartlarda embriyonun endometriyuma teması 5. veya 6. günlerde embriyo blastosist aşamasındayken gerçekleşir. Bu nedenle blastosist aşamasında ET yapılması

embriyonun günü ve endometriyum uyumunun maksimum olması nedeniyle implantasyon başarısını artıracaktır. CC *in vitro* ko-kültür şartlarında canlılığını yaklaşık 9-10. güne kadar korur. Bu sayede blastosist aşamasına kadar CC embriyoya desteğini devam ettirebilir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda embriyoların CC ile ko-kültür edilmesi ve ET esnasında uterin kaviteye embriyo ile birlikte CC transfer edilmesinin daha iyi ART sonuçları verdiği görülmüştür (199, 259).

CC embriyoya *in vivo* ortamda olduğu gibi doğal bir ortam sağlamak ve onun gelişimi destekleyerek implantasyon başarısını artırabilmektedir. Böylece transfer edilecek embriyo sayısı gönül rahatlığı ile azaltılarak çoğul gebeliğin anne ve bebek açısından istenmeyen etkilerinden kaçınılabilir. Ayrıca blastosist aşamasındaki embriyonun implantasyon potansiyeli 2. ve 3. gün embriyolarına kıyasla daha kolay öngörülebilir (260-262).

IVM, OHSS riski ve öyküsü olan PCOS hastaları için iyi bir seçenektir. Düşük dozlarda KOH protokolü alan veya hiç almayan hastalardan elde edilen immatür oositlerin *in vitro* ortamda ko-kültür sistemleri kullanılarak matürasyonlarının tamamlanmasını amaçlayan bir ART'dir (263). Bu sayede KOH protokollerinin yan etkilerinden, mali yükünden ve sık aralıklarla hasta takibinden kaçınılmış olunur. Ancak *in vitro* koşullarda mature olan oositlerin gebelik oranların, *in vivo* matürasyonunu tamamlayan oositlerle kıyaslandığında daha düşük olduğu görülür (264). Gelişmiş ko-kültür sistemleri, sadece oosit matürasyonuna katkıda bulunmaz ayrıca embriyonun metabolik gelişimini de destekler. Ayrıca beslenmesini sağlar. Toksik atıkların ve serbest oksijen radikalleri gibi zararlı maddelerin uzaklaştırılmasını sağlar (265-268). Bu tekniğin yoğun iş yükü, teknik beceri ve bilgi gerektirmesi yaygın kullanımını kısıtlamaktadır (269). Yaşı 35'den büyük, FSH düzeyleri yüksek, uygulanan KOH protokollerine kötü ovaryan yanıtı olan, daha önce bir çok başarısız IVF denemesi ve kötü kalite embriyo hikayesi olan hastalarda ko-kültür sistemlerinin kullanımı önerilmektedir (270).

Shourkir ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonuçlarına göre konvansiyonel IVF yönteminin, ICSI yöntemine kıyasla blastosist evresine ulaşma oranları anlamlı şekilde daha yüksektir (271). Yine benzer şekilde konvansiyonel IVF yönteminin, ICSI yöntemine kıyasla blastosist evresine ulaşma oranların daha yüksek olduğu

çalışmalar vardır (272, 273). Bu durum CC'nin oosit matürasyonu, embriyo gelişimi ve implantasyon potansiyeli üzerindeki pozitif etkisine bağlı olabilir.

Ebner ve arkadaşlarının 2006 yılında 57 hastadan toplanan 650 oosit üstünde yapmış oldukları bir çalışmada ICSI işlemi uygulanan oositlerin bir kısmını tam denude edilmiş, diğerlerini ise kısmi denude ederek CC uzaklaştırılmadan inkübe edilmiştir. Daha sonra araştırmacılar CC'nin oosit matürasyonu, embriyo gelişimine pozitif etkisi olup olmadığını değerlendirmek istemişlerdir. Bu teoriyi araştırmak için, Ebner ve arkadaşları kardeş oositleri CC denude edilmiş ve kısmi denude edilmiş iki gruba ayırarak 6 aylık prospektif bir çalışma yapmışlardır. Şiddetli erkek faktörü olan hastaları çalışmanın sonuçlarını etkileyeceği için çalışmaya dahil etmemişlerdir (sperm sayımı  $> 8 \times 10^6 / \text{ml}$ ,  $> \% 10$  normal morfoloji). Denudasyon işleminde tüm COC, aynı şekilde 30 sn hyaluronidaz enzimiyle muamele edilmiş daha sonra elle çekilmiş cam Pastör pipeti kullanılmıştır. Ancak bu pipetler CC'nin tamamen denude edilerek soyulduğu grupta daha küçük çaplı olacak şekilde elle çekilirken, CC'nin kısmi denude edilerek bir kısmının oosit üstünde kalmasının arzu edildiği grupta daha büyük çaplı olacak şekilde elle çekilmiştir (14).

Denudasyon işlemi yapılırken nükleer matürasyonu değerlendirebilecek kadar CC'nin uzaklaştırılmasına dikkat edilmiş ve yaklaşık olarak oosit üstünde 300-500 CC kalacak şekilde denudasyon işlemi uygulanmıştır. Tam denude edilen grup kontrol grubu olarak, kısmi denude edilen grup ise çalışma grubu olarak ifade edilmiştir. Çalışma grubu geriye kalan CC'nin dağılımına göre ikiye ayrılmış, CC'nin gruplar halinde olduğu oositler A (n = 202), homojen oositi çepeçevre saran CC'nin olduğu oositler B (n = 75) olarak sınıflandırılmıştır. Toplanan 650 oositin 575 tanesi M2, 24 tanesi GV, 51 tanesi M1 olduğu ve M1 oositler matürasyonlarını tamamlamaları için 24 saat inkübe edildiği belirtilmiştir. Daha sonra tüm M2 oositlere ICSI işlemi yapılmış, işlemden 18-20 saat sonra 2PN ve fertilizasyon kontrolü yapılmıştır. Zigot, 2. gün 3. gün, 4. gün, 5. gün evresindeki embriyolar blastosist sayısı ve evresi, özelliği, fragmentasyon yüzdesi, multinükleasyon ve sıkışma özelliği açısından değerlendirilmiştir.

Ebner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre; mayozun tekrar başlayıp M1 oositlerin matürasyonlarını tamamlayarak M2 oosite dönme oranları

kontrol grubunda, çalışma grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (%44,7 - %71,8 p=0,0006). 2PN oranları kontrol grubunda, çalışma grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuşlardır (%76,5 - %68,6 p=0,033). Normal fertilize olan oosit yani 2PN oranının çalışma grubunda düşük olmasını CC'nin ICSI işlemini zorlaştırmış olabileceğine bağlamışlardır. 2. gün ve 3. gün iyi kalite embriyo oranları kontrol grubunda, çalışma grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuşlardır (%40,7 - %54,5 p=0,006) (%42,5 - %52,8 p=0,038). Blastosist oranlarını kontrol grubunda, çalışma grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuşlardır (%46,7 - %62,5 p=0,028). Araştırmacılar çalışmanın sonunda CC'nin varlığının embriyo kalitesi, mayozun tekrar başlayarak oosit matürasyonunun tamamlanmasına olumlu yönde etki ettiği sonucuna varmışlardır (14).

Ayrıca bu çalışmada araştırmacılar çalışma grubunu da CC'nin dağılım tipine göre kendi içinde değerlendirmişlerdir. CC kümeler halinde dağılmış olan A tipi grupta 2PN oranını, CC oosit çevresinde homojen dağılan B tipi gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuşlardır (% 72,8- % 57,3 p= 0,0014). CC'nin oositi çepeçevre kapladığı B tipi grupta ICSI sonrası dejenerasyon oranının A tipi gruba kıyasla anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuşlardır (% 6,9 - % 17,3 p=0,01). Normal fertilize olan yani 2PN oranının A tipi grupta yüksek olması ve ICSI sonrası dejenerasyon oranının B tipi grupta yüksek olmasının sebebinin B tipi gruptaki CC'nin oositi çepeçevre kuşatmasının ICSI işlemini güçleştirmesinden kaynaklanmış olabileceğini şeklinde açıklamışlardır (14).

Standart prosedürde ICSI işleminde, mikropipetle sperm enjeksiyonu oositin saat 3 hizasından yapılır. CC'nin varlığının bu işlemin tam olarak saat 3 hizasından yapılmasını güçleştirdiğini, normal fertilize olmuş 2PN oosit oranlarının düşük olmasının ve ICSI sonrası dejenerasyon oranlarının yüksek olmasının bu teknik zorluğundan kaynaklanmış olabileceğini ifade etmişlerdir. Ancak bu negatif durumun embriyo gelişim aşamasında tersine döndüğünü, CC'nin varlığının dağılım tipinden bağımsız olarak, oosit matürasyonunun tamamlanmasında ve kaliteli embriyo gelişiminde pozitif yönde etkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Araştırmacılar 2. gün, 3. gün embriyo ve blastosist oranlarının B tipi grupta A tipi

gruba kıyasla daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (%50,7 -%70,6 p=0,036) (%50,0 - %64,7) (%30,2 -%58,3 p=0,07) (14).

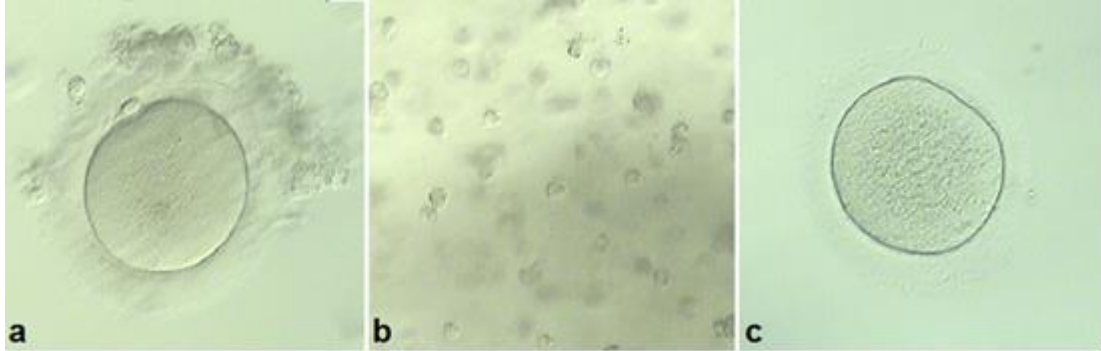
### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Araştırmanın Tasarımı ve Hasta Seçimi

Bu çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan izin alınmıştır (08.10.2020 tarih ve OMÜ KAEK 2020/ 588 karar). Etik Kurul kararı ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğüne başvurulup 14.10.2020 tarih ve 15374210-302.08.01-E.17842 sayılı onayı ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezinden tez için gerekli veriler elde edilmiştir. Kapsamı arşiv taraması olan çalışma, dosya taraması niteliğinde olup 01.07.2019- 01.07.2020 tarih aralığını içermektedir. Veriler, dahil etme ve dışlama kriterlerine uyan tüm infertilite tedavisi gören hasta dosyaları ile Embriyoloji Laboratuvarı formları üzerinden retrospektif olarak toplanmıştır.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran 18-45 yaş arası infertil kadın hastalar arasında, üremeye yardımcı tekniklerden ICSI uygulanmış hastalar, açıklanamayan infertilite tanılı hastalar, pelvik ve over cerrahisi olmayanlar, çift overli olanlar, ailede erken menapoz hikayesi olmayanlar, sigara kullanmayanlar, kemoterapi tedavisi almamış hastalar ile Diabetes Mellitüs, hipertansiyon, tiroid fonksiyon bozukluğu, karaciğer yetmezliği, hepatit ve human immunodeficiency virus (HIV) nedeni enfeksiyöz hastalıklar, otoimmün hastalıklar gibi sistemik hastalığı bulunmayanlar çalışmaya alındı. 18 yaş altı hastalar ile 45 yaş üstü kadın hastalar, düşük over rezervi olan beşin altında antral folikül sayısına sahip kadın hastalar (AFC<5), eşleri oligoasthenoteratozoospermia (OAT) olan hastalar, pelvik ve over cerrahisi geçirmiş kadın hastalar, tek overli olan hastalar, daha önce gonadotropin stimülasyonuna kötü cevap verenler, ailede erken menapoz hikayesi bulunanlar, sigara kullananlar, kemoterapi almış hastalar, Diabetes Mellitüs, hipertansiyon, tiroid fonksiyon bozukluğu, karaciğer yetmezliği, hepatit B, hepatit C, HIV gibi enfeksiyöz hastalıkları, otoimmün hastalıklar gibi sistemik hastalığı bulunanlar, azospermi tanılı eşlerden TESE yöntemi ile sperm eldesi yapılan kadın hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Sperm konsantrasyonu 15 milyon/ ml'nin üzerinde olan erkeklerin eşleri çalışmaya alındı. Açıklanan çalışmanın dahil etme ve dışlama kriterleri ile fertilizasyonu, embriyo gelişimini, implantasyonu etkileyebilecek diğer

faktörler çalışma dışında bırakıldı. Açıklanamayan infertilite tanılı hasta verileri incelenerek, denudasyon etkilerinin diğer etkenlerden bağımsız olarak yorumlanması hedeflendi. Klinik işlem prosedürü: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi bünyesindeki ameliyathane şartlarında, kadın hastalardan aspire edilen folikül sıvısı Embriyoloji Laboratuvarına transfer edilir. Açıklığı 200µm'lik cam pastör pipetler yardımıyla yağ altı kültür medyumundan droplar içeren petrielerde inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda kümülüs-oosit kompleksi 200µm'lik cam pipetler ile denudasyonun yapılacağı diğer petriye taşınır. Standart prosedür olarak her bir oosit hyaluronidaz enzimi kullanılarak farklı çap açıklıkları olan (200µm, 140µm ve 135µm) pipetler yardımı ile kümülüslerinden uzaklaştırılır (Şekil 5). Kümülüs ve granüloza hücrelerinin mekanik ve işlevsel uzaklaştırma işlemi, çapları daha dar olan 140µm ve 135µm'lik plastik stripperlar aracılığıyla rastlantısal olarak yapılır. 140µm çaplı pipet ile 5 defa al-ver yapılarak gerçekleştirilen kısmi denudasyon sonucunda 15-20 granüloza hücresi oosit etrafında kalır. Kısmi denudasyon uygulanan oositlerin etrafındaki granüloza hücreleri, ICSI işlemine engel olmayacak ve matürasyon değerlendirmesine imkan verecek sınırdadır. Çapı 135µm pipet ile yapılan tam denudasyon sonucunda oosit etrafındaki granüloza hücrelerinin tümü uzaklaştırılır (14, 274).



**Şekil 5.** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi- Embriyoloji Laboratuvarı arşivinden invert mikroskop altında çekilmiş fotomikrograf örnekleri izlenmektedir. a) 140µm çaplı denudasyon sonrası M2 oosit (20X), b) CC (40X), c) 135µm çaplı pipetle denudasyon sonrası M1 oosit (20X).

Bu çalışmada klinik prosedürden yola çıkılarak retrospektif olarak hasta dosyaları tarandı. Oosit denudasyonunda kullanılan pipet çaplarına göre veriler iki gruba ayrıldı.

**Grup 1:** Standart 140µm çaplı pipet ile oositleri kısmi denudasyon yapılan hastalar (SKDG) ( $n_1= 81$ )

**Grup 2:** Standart 135µm çaplı pipet ile oositleri tam denudasyon yapılan hastalar (STDG) ( $n_2= 76$ )

İnfertilite tanısı alan 01.07.2019 – 01.07.2020 tarihleri arasındaki bir yıllık sürede dahil etme ve dışlama kriterlerine uyan toplam 157 kadın hasta ve bu hastalardan toplanan toplam 2034 oositin tümünden (Grup 1 oositleri= 1045, Grup 2 oositleri= 989) sağlanan veriler çalışmaya alındı.

Çalışmada, kısmi ya da tam oosit denudasyonu yapıldıktan sonra kalan granüloza ve kümülüs hücrelerinin aşağıdaki parametreler üzerine etkisi araştırılmıştır:

Oosit morfolojisi, oosit matürasyonu, immatür, matür oosit sayısı, oosit dejenerasyon oranı, toplam fertilize olan oosit sayısı, normal fertilize olan oosit sayısı (2PN), fertilizasyon oranları, gelişen embriyo sayısı (2. gün, 3. gün, 4. gün, 5. gün, 6. gün embriyo sayısı), grupların toplam embriyo sayısı, yarıklanma ve blastosist evresine ulaşan embriyo sayısı, transfer sayısı, fresh transfer sayısı, donmuş transfer sayısı, total transfer sayısı, hiç embriyo transferi yapılamayan hasta sayısı, embriyoların 2. ve 3. gün embriyo skorlarına göre karşılaştırılması, blastosist aşamasındaki embriyoların embriyo kalitesi açısından karşılaştırılması, embriyoların gradelerine göre sınıflandırılması, transfer edilen embriyoların gradelerinin karşılaştırılması, biyokimyasal gebelik ve klinik gebelik sayısı, canlı doğum sayısı, abortus, ektopik gebelik, fetal kardiyak aktivitenin olmaması (FKA-) gibi patolojik nedenlerle dilatasyon ve küretaj (D/C) ile gebeliği sonlanan hasta sayısı (275, 276).

### **3.2 Veri Toplanması ve İstatistiksel Analizi**

Bu çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezine 01.07.2019 – 01.07.2020 tarihleri arasında baş vuran 18-45 yaş arası açıklanamayan infertilitesi olan kadın hastalar seçildi ve retrospektif olarak dosya tarama yöntemi ile veriler toplandı.

Denudasyon yapılan pipetlerin çap açıklığına göre iki farklı grup oluşturuldu. İstatistiksel analizler SPSS 21.0 programı ile yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (SS), ortanca (min-maks) ve frekans (%) olarak sunuldu. Verilerin normal dağılım varsayımını kontrol etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılışa sahip olmayan iki gruba ait verilerin karşılaştırması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Frekanslar, Pearson Ki-kare, Süreklilik Düzeltmeli Ki-kare ve Fisher Exact testi kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Demografik Bilgiler

Çalışmaya alınan açıklanamayan infertilite tanılı toplam 157 hastanın gruplar içi dağılımı incelendi.

**Tablo 1.** Grupların demografik ve oosit bilgileri

Hasta	Grup 1 (n <sub>1</sub> =81)		Grup 2 (n <sub>2</sub> =76)		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	
Yaş	32,469±4,947	33,000(20,0-43,0)	31,711±5,308	31,000(23,0-43,0)	,267
FSH	7,7385±4,146	6,5000(,40-22,00)	6,9658±3,474	6,250(,80- 23,00 )	,314
LH	3,1194±1,944	2,4000(1,10-10,00)	3,7299±2,170	3,200(1,10-10,00 )	,075
E2(tedavi öncesi)	49,346±13,899	47,000(30,0-134,0)	48,658±15,4174	44,500(28,0-104,0)	,179
Progesteron	,6631±,510	,500(,05-2,70)	,7049±1,204	,400(,05-10,00)	,126
Prolaktin	23,357±11,450	22,000(4,9-68,0)	24,514±16,934	20,000(2,0-86,0)	,663
E2(folikülometri gününde)	1981,037±2080,439	1445,000 (38,0-12792,0)	1774,816±1606,316	1270,500(62,0-10353,0)	,817
Folikül sayısı	14,210±11,703	11,000 (3,0-50,0)	15,039±12,744	12,000(3,0-50,0)	,692
Folikül hacmi	16,025±2,382	16,000 (6,0-20,0)	16,184±2,243	16,000(10,0-21,0)	,908
Total folikül hacmi	231,173±199,497	187,000 (30,0-1000,0)	245,711±219,323	192,000(51,0-1000,0)	,785
Toplanan oosit sayısı	12,901±7,006	11,000 ( 5,0-38,0)	13,013±8,116	10,500(4,0-50,0)	,739

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma.

Grup 1’de oositlerine SKD uygulanan hastalar ve Grup 2’de oositlerine STD yapılan hastalar grupların denklığı açısından yaş, FSH, LH, E2, progesteron, prolaktin, folikül sayısı, folikül hacmi, total folikül hacmi, toplanan oosit sayısı parametrelerine göre karşılaştırıldı (Tablo 1).

**Tablo 2.** Gruplara göre oosit morfolojisi

Oosit morfolojisi	Grup 1 (n <sub>1</sub> =81)	Grup 2 (n <sub>2</sub> =76)	P*
	n (%)	n (%)	
Normal	76 (93,8)	69 (%90,8)	0,678
Anormal	5 (%6,2)	7 (%9,2)	

\* Süreklilik Düzeltmeli Ki-kare

Her iki gruptaki oosit morfolojileri Tablo 2’de karşılaştırıldı. Grupların demografik bilgileri ve oosit morfolojilerinin birbirine benzer ve denk özelliklere sahip olduğu görüldü ( $p>0,05$ ; Mann-Whitney U, Süreklilik Düzeltmeli Ki-kare).**4.2 Grup 1 (SKDG) ve Grup 2 (STDG)’nin istatistiksel karşılaştırılması**

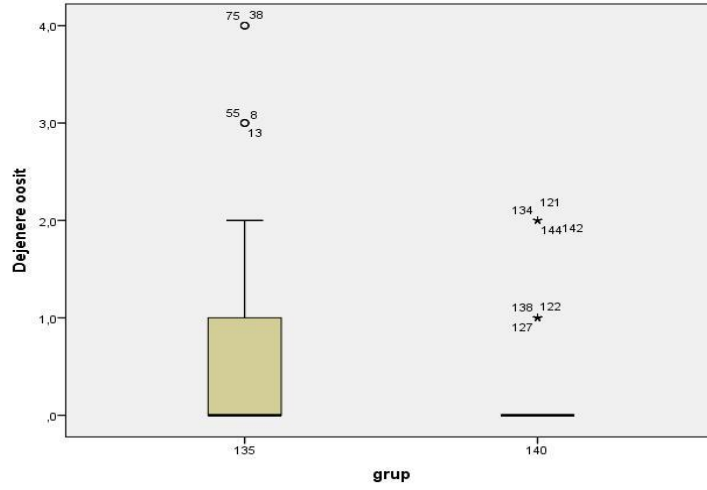
SKDG ve STDG’deki hastalar oosit sayısı, oosit matürasyonu, oosit dejenerasyonu açısından karşılaştırıldı.

**Tablo 3.** Gruplara göre oosit özellikleri

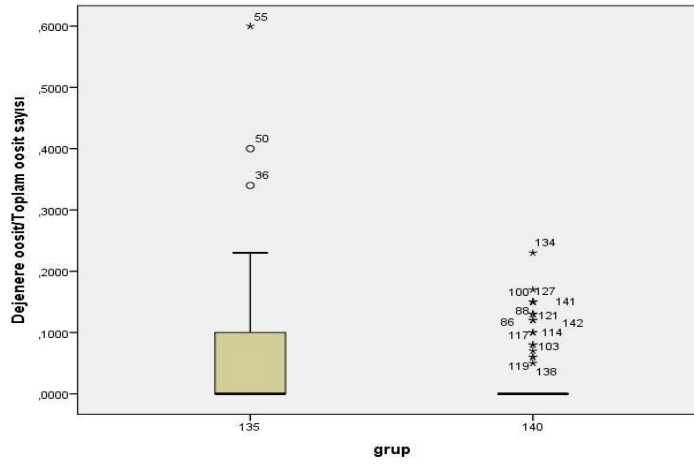
Oosit	Grup 1		Grup 2		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	
Toplanan oosit sayısı	12,901±7,006	11,000(5,0-38,0)	13,013±8,116	10,500(4,0-50,0)	,739
M1 oosit sayısı	1,123±1,592	1,000(,0-10,0)	1,368±1,958	1,000(,0-10,0)	,574
M1/ Toplam oosit	,089±,115	,060(,000-,500)	,094±,108	,095(,000-,590)	,444
M2 oosit sayısı	10,272±5,511	9,000(3,0-31,0)	9,566±5,893	8,000(2,0-36,0)	,293
M2/ Toplam oosit	,807±,162	,840(,340-1,500)	,753±,176	,800(,380-1,000)	,075
GV oosit sayısı	1,074±1,602	1,000(,0-10,0)	1,237±1,965	,000(,0-12,0)	,902
GV/ Toplam oosit	,085±,114	,060(,000-,580)	0,898±,119	,000(,000-,500)	,922
Dejenere oosit sayısı	,309±,605	,000(,0-2,0)	,724±1,102	,000(,0-4,0)	,018
Dejenere/ Toplam oosit	,027±,054	,000(,000-,230)	,060±,106	,000(,000-,600)	,036
Empty zona sayısı	,099±,406	,000(,0-2,0)	,105±,385	,000(,0-2,0)	,697
Empty zona/ Toplam oosit	,006±,028	,000(,000-,190)	,008±,031	,000(,000-,200)	,677

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma.

Gruplar arasında sadece Grup 2’nin (STDG) dejenere oosit sayısı (Şekil 6) ve dejenere oosit sayısının toplam oosit sayısına oranı (Şekil 7), Grup 1’e (SKDG) göre anlamlı olacak şekilde yüksek bulundu ( $p=0,018$ ,  $p=0,036$ ; Mann-Whitney U). SKDG’de dejenere oosit oranı daha düşük tespit edildi (Tablo 3). Grup 1 ve Grup 2 arasında toplanan oosit sayısı, M1 oosit sayısı, M1’in toplam oosite oranı, M2 oosit sayısı, M2’nin toplam oosite oranı, GV oosit sayısı, GV’nin toplam oosite oranı, empty zona sayısı, empty zona sayısının toplam oosite oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.



Şekil 6. Grup 1 ve Grup 2'deki dejenere oositleri göstermektedir (p=,018).



Şekil 7. Grup 1 ve Grup 2'deki dejenere oositlerin toplam oositlere oranını göstermektedir (p=0,036).

Tablo 4. Grup 1 ve Grup 2'deki fertilizasyon oranları

Fertilizasyon	Grup 1		Grup 2		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S	Ortanca (Min-Max)	
Fertilize olan oosit sayısı	7,593±4,711	7,000(1,0-23,0)	6,803±4,451	6,000(,0-20,0)	,282
2PN	7,370±4,592	7,000(1,0-23,0)	6,487±4,419	6,000(,0-21,0)	,199
Fertilizasyon oranı	,722±,211	,750(,150-1,200)	,707±,243	,710(,000-1,800)	,371

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, 2PN: 1. gün normal fertilizasyon.

Gruplar (STDG, SKDG) kendi arasında fertilizasyon sayıları (Tablo 4), birinci gün normal fertilizasyon sayıları ve oranları açısından karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p>0,05$ ; Mann-Whitney U).

**Tablo 5.** Grup 1 ve Grup 2’de gelişen embriyo sayıları

Gelişen embriyo sayıları	Grup 1		Grup 2		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S	Ortanca (Min-Max)	
1. Gün embriyo	7,593±4,711	7,000(1,0-23,0)	6,803±4,451	6,000(,0-20,0)	,282
2. Gün embriyo	7,086±4,433	6,000(1,0-22,0)	6,360±4,339	6,000(1,0-20,0)	,260
3. Gün embriyo	6,383±4,208	5,000(,0-22,0)	5,880±4,299	5,000(,0-18,0)	,353
4. Gün embriyo	4,605±4,224	4,000(,0-15,0)	4,107±4,072	4,000(,0-15,0)	,434
5. Gün embriyo	3,222±3,794	1,000(,0-7,0)	2,933±3,410	2,000(,0-14,0)	,837
6. Gün embriyo	1,309±1,881	,000(,0-7,0)	1,053±1,815	,000(,0-9,0)	,348

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, 1. gün: 2PN sayısı, 2. ve 3. gün: Klivaj dönemi embriyoları, 4. gün : Kompakt embriyo, 5. ve 6. gün embriyoları: Blastokist.

SKDG ve STDG’deki embriyoların 6 gün boyunca yapılmış takiplerinin aynı günleri aralarında karşılaştırıldı (Tablo 5). Gruplar arasında gelişen embriyo sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ; Mann-Whitney U).

**Tablo 6.** İkinci gün embriyolarının gruplar arası karşılaştırılması

2. Gün embriyo grade	Grup 1		Grup 2		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	
2. Gün embriyo sayısı	7,086±4,433	6,000(1,0-22,0)	6,360±4,339	6,000(1,0-20,0)	,260
Blastomer A (Günü ile uyumlu blastomer sayısı)	4,30±3,124	4,00(0-15)	3,67±2,992	3,00(0-14)	,176
Blastomer A / Toplam 2. gün embriyo sayısına oranı	,610±,231	,600(,000-1,000)	,589±,295	,666(,000-1,000)	,938
Blastomer B (Günü ile uyumlu olmayan blastomer sayısı)	2,79±2,223	2,00(0-10)	2,69±2,557	2,00(0-12)	,406
Blastomer B / Toplam 2. gün embriyo sayısına oranı	,389±,231	4,000(,000-1,000)	,414±,295	,340(,000-1,000)	,717
Fragmantasyon A Fragmantasyon< % 10)	4,123±3,284	3,000(,0-13,0)	3,773±3,351	3,000(,0-15,0)	,472
Fragmantasyon A / Toplam 2. gün embriyo sayısına oranı	,602±,336	,666(,000-1,000)	,580±,344	,600(,000-1,000)	,797
Fragmantasyon B Fragmantasyon %10 - %25	1,420±1,787	1,000(,0-11,0)	1,413±1,809	1,000(,0-8,0)	,826
Fragmantasyon B / Toplam 2. gün embriyo sayısına oranı	,182±,201	,142(,000-1,000)	,221±,234	,170(,000-1,000)	,292
Fragmantasyon C Fragmantasyon> %25	1,543±2,196	1,000(,0-12,0)	1,227±1,864	1,000(,0-10,0)	,408
Fragmantasyon C / Toplam 2. gün embriyo sayısına oranı	,215±,286	,090(,000-1,000)	,204±,280	,090(,000-1,000)	,778
Morfoloji A (Blastomerler eşit büyüklükte ve özellikte)	3,420±3,26	3,000(,0-15,0)	2,507±2,068	2,000(,0-9,0)	,190
Morfoloji A / Toplam 2. gün embriyo sayısına oranı	,457±,302	,4545(,000-1,000)	,40736±,281	,450(,000-1,000)	,404
Morfoloji B (Blastomerler eşit değil)	3,605±2,606	4,000(,0-12,0)	3,920±3,521	3,000(,0-18,0)	,914
Morfoloji B / Toplam 2. gün embriyo sayısına oranı	,537±,2983	,5454(,000-1,000)	,60116±,283	,560(,000-1,200)	,178

\*Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma.

Grup 1 ve Grup 2, ikinci gün embriyo sayısı ve gradelerine göre karşılaştırıldı (Tablo 6). Gruplar arasında 2. gün embriyo sayısı ve evresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ; Mann-Whitney U).

**Tablo 7.** Üçüncü gün embriyolarının gruplar arası karşılaştırılması

3. Gün embriyo grade	Grup 1		Grup 2		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	
3. Gün embriyo sayısı	6,383±4,208	5,000(,0-22,0)	5,880±4,299	5,000(,0-18,0)	,353
Blastomer C (Günü ile uyumlu blastomer sayısı)	5,06±3,861	4,00(0-18)	4,00±3,128	3,00(0-14)	,110
Blastomer C / Toplam 3. gün embriyo sayısına oranı	,775±,247	,818(,000-1,000)	,695±,295	,750(,000-1,000)	,122
Blastomer D (Günü ile uyumsuz blastomer sayısı)	1,32±1,532	1,00(0-6)	1,88±2,290	1,00(0-12)	,131
Blastomer D / Toplam 3. gün embriyo sayısına oranı	,224±,247	,181(,000-1,000)	,321±,293	,250(,000-1,000)	,037
Fragmantasyon D Fragmantasyon < %10)	3,95±3,507	3,00(0-13)	3,37±3,271	3,00(0-15)	,305
Fragmantasyon D/ Toplam 3.gün embriyo sayısına oranı	,609±,354	,666(,000-1,000)	,559±,362	,555(,000-1,000)	,442
Fragmantasyon E Fragmantasyon %10 - %25	1,14±1,506	1,00(0-7)	1,09±1,678	,00(0-8)	,612
Fragmantasyon E/ Toplam 3. gün embriyo sayısına oranı	,192±,251	,105(,000-1,000)	,184±,250	,115(,000-1,000)	,793
Fragmantasyon F Fragmantasyon> %25	1,30±1,854	,00(0-7)	1,44±2,139	1,00(0-10)	,576
Fragmantasyon F/ Toplam 3.gün embriyo sayısına oranı	,197±,272	,000(,000-1,000)	,293±,459	,145(,000-3,000)	,247
Morfoloji C (Blastomerler eşit büyüklükte ve özellikte)	2,827±2,354	2,000(,0-12,0)	2,587±2,520	2,000(,0-14,0)	,326
Morfoloji C / Toplam 3. gün embriyo sayısına oranı	,476±,278	,500(,000-1,000)	,439±,310	,430(,000-1,000)	,367
Morfoloji D (Blastomerler eşit özellikte değil)	3,556±2,872	3,000(,0-13,0)	3,293±2,926	3,000(,0-15,0)	,441
Morfoloji D / Toplam 3. gün embriyo sayısına oranı	,523±,278	,500(,000-1,000)	,569±,304	,580(,000-1,000)	,255

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma.

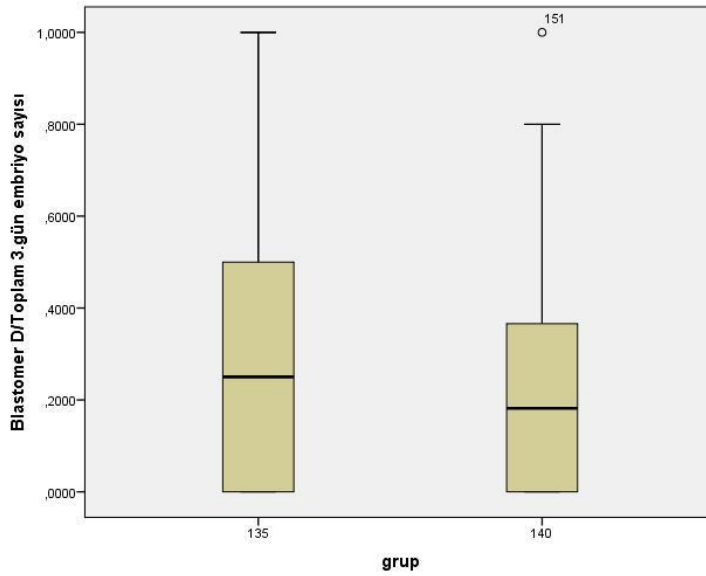
Grup 1 ve Grup 2 üçüncü gün embriyoları sayı ve gradelerine göre karşılaştırıldı (Tablo 7). Yarıklanma dönemi embriyo değerlendirilmesi ALPHA / ESHRE konsensus ilkeleri temel alınarak yapıldı (Tablo 8) (151).

**Tablo 8.**Yarıklanma dönemi embriyoların değerlendirilmesi

Derece	Değerlendirme	Açıklama
1	İyi	< %10 fragmantasyon, MN yok, gününe uygun hücre boyutu
2	Orta	%10 - %25 fragmantasyon, MN yok, hücrelerin boyutlarının çoğunluğu gününe uygun
3	Kötü	> %25 fragmantasyon, MN var, Hücrelerin boyutları gününe uygun değil

MN: Multinükleasyon

Günü ile uyumsuz blastomer sayısına ve boyutuna sahip (Tablo 8 ve Tablo 7) 3. gün embriyo sayısının, toplam 3. gün embriyo sayısına oranında grup 2’de, grup 1’e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p=0,037$ ; Mann-Whitney U).



**Şekil 8.** Blastomer D / Toplam 3. gün embriyo sayısına oranı

Gelişim gününe uyumlu eşit boyutlarda ve sayıda blastomerlere sahip embriyolar ile fragmantasyon parametleri açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. Denudasyonu 135µm’lik pipet ile yapılan oositlerden gelişen; blastomer sayısı 3. gün embriyo blastomer sayısı ile uyumsuz embriyoların toplam 3. embriyolarına oranı, SKDG’na göre yüksek tespit edilmiştir (Şekil 8).

**Tablo 9.** Gruplara göre blastosist evresine ulaşabilen embriyolar

Embriyo evresi	Grup 1 (n <sub>1</sub> =81)		Grup 2 (n <sub>2</sub> =75)		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	
Yarıklanma evresindeki embriyo sayısı	21,062±13,156	20,000(2,0-67,0)	19,133±12,886	16,000(3,0-54,0)	,301
Blastosist evresindeki embriyo sayısı	4,531±5,383	2,000(,0-20,0)	3,987±4,886	2,000(,0-23,0)	,695

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, Yarıklanma evresi embriyolar: 1. gün, 2. gün, 3. gün embriyoları, Blastosist evresi embriyolar: 5.gün, 6. gün embriyoları.

Grup 1 (SKDG) ve Grup 2 (STDG) blastosist evresine kadar gelişebilen embriyo sayılarına göre karşılaştırıldı. Gruplar arasında erken embriyo gelişimi ve blastosist aşamasına ulaşabilen embriyo sayıları (Tablo 9) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0,301 p=0,695; Mann-Whitney U).

Grup 1 (140µm) ve Grup 2 (135µm) transfer edilen embriyo sayılarına göre karşılaştırıldı.

**Tablo 10.** SKDG ve STDG’da gelişim günlerine göre transfer edilen embriyolar

Transfer edilen embriyolar	Grup 1		Grup 2		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	
Embriyo transferi (2.gün)	,136±,440	,000(,0-2,0)	,160±,520	,000(,0-2,0)	,961
Embriyo transferi (3.gün)	,79±,847	1,00(0-2)	,59±,718	,00(0-2)	,160
Embriyo transferi (4. gün)	,111±,418	,000(,0-2,0)	,200±,545	,000(,0-2,0)	,225
Embriyo transferi (5.gün)	,160±,431	,000(,0-2,0)	,160±,466	,000(,0-2,0)	,804
Embriyo transferi (6. gün)	,037±,190	,000(,0-1,0)	,027±,162	,000(,0-1,0)	,714
Toplam fresh embriyo transfer sayısı	1,235±,711	1,000(,0-3,0)	1,133±,684	1,000(,0-2,0)	,383
Toplam donmuş embriyo transfer sayısı	,383±,734	,000(,0-3,0)	,320±,573	,000(,0-2,0)	,928
Toplam embriyo transfer sayısı (Taze ve donmuş transferler)	1,617±,783	2,000(,0-4,0)	1,453±,683	1,000(,0-4,0)	,231

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma.

Gruplar arasında günlere göre transfer edilen embriyo sayıları (Tablo 10) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,961$   $p=0,160$   $p=0,225$   $p=0,804$   $p=1,000$   $p=0,383$   $p=0,928$   $p=0,231$ ; Mann-Whitney U).

**Tablo 11.** Gruplara göre erken embriyonal dönem embriyo gelişim oranları

Embriyo gradeleri	Grup 1		Grup 2		P*
	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	AO± S.S.	Ortanca (Min-Max)	
İyi evredeki embriyo sayısı	2,99±1,907	3,00(0-8)	2,69±1,708	2,00(0-9)	,431
İyi evredeki embriyo sayısı /Toplam embriyo sayısı	,845±,199	1,000(,33-1,00)	,841± ,229	1,000(,00-1,00)	,810
Kötü evredeki embriyo sayısı	,765±1,040	,000(0-4,0)	,667±1,017	,000(0-4,0)	,496
Kötü evredeki embriyo sayısı /Toplam embriyo sayısı	,154±,199	,000(,00-,67)	,158±,229	,000(,00-1,00)	,810

\* Mann-Whitney U, n: Hasta sayısı, AO: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma.

Grup 1 (SKDG) ve Grup 2 (STDG) iyi ve kötü evre gelişen embriyo sayılarına göre karşılaştırıldı (Tablo 11). Gruplar arasında iyi ve kötü evre gelişen embriyo sayısı ve oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,431$   $p=0,810$   $p=0,496$   $p=0,810$ ; Mann-Whitney U).

**Tablo 12.** Gruplarda embriyo transfer oranları

Embriyo transfer durumu	Grup 1	Grup 2	P*
	n(%)	n(%)	
Transfer yapılan hasta sayısı	78(96,3)	70(92,1)	,485
Transfer yapılmayan hasta sayısı (Donmuş ve taze)	3(3,7)	5(6,5)	
Transfer yapılmayan hasta sayısı (Embriyo gelişmeyen)	0	1(1,3)	

\*Fisher Exact test, n: Hasta sayısı.

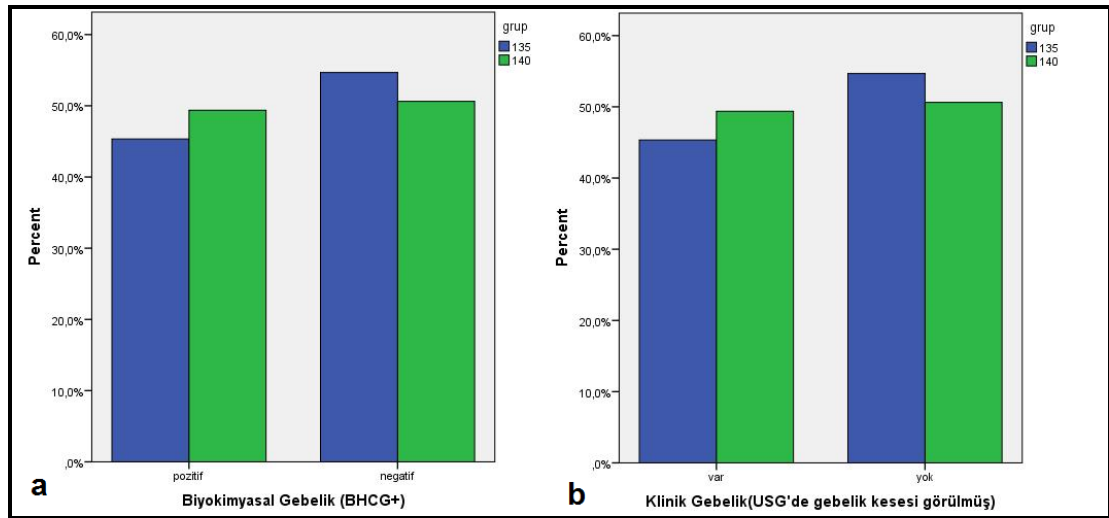
Grup 1 (SKDG ve Grup 2 (STDG) embriyo transferi yapılan hasta sayılarına göre karşılaştırıldı (Tablo 12). İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p=0,485$ ; Fisher Exact test).

**Tablo 13.** Gebelik durumu ve gebelik kaybı

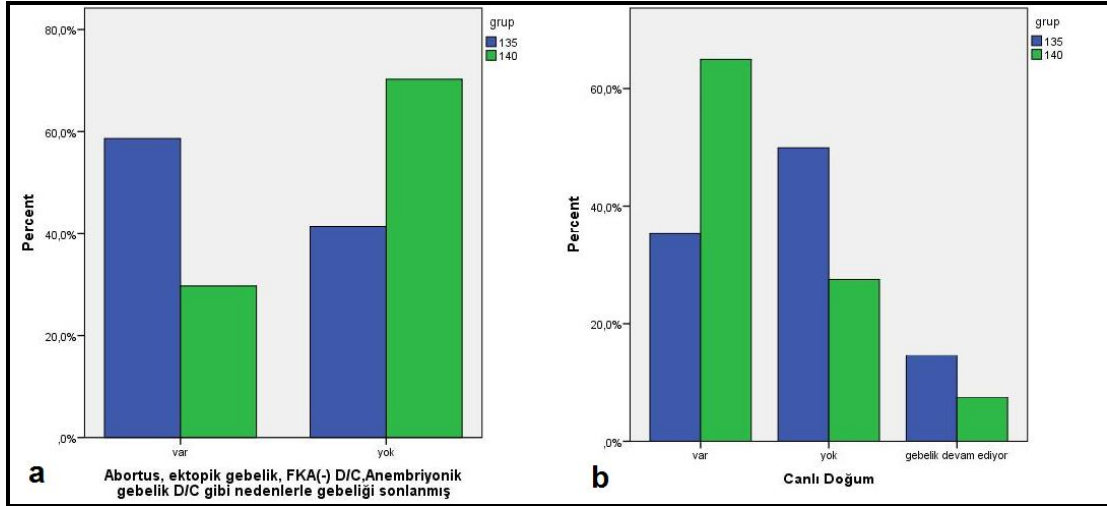
Gebelik	Grup 1	Grup 2	P
	n (%)	n (%)	
Biyokimyasal gebelik ( $\beta$ hCG pozitif)	40 (49,4)	34 (45,3)	,613*
Gebelik oluşmayanlar ( $\beta$ hCG negatif)	41 (50,6)	41 (54,7)	
Klinik gebelik (USG'de gebelik kesesi izlendi)	40 (49,4)	34 (45,3)	,613*
Klinik gebelik oluşmayanlar (USG'de gebelik kesesi izlenmedi)	41 (50,6)	41 (54,7)	
Canlı doğum	26 (65,0)	12 (35,3)	,039*
Ölü doğum vb.	11 (27,5)	17 (50,0)	
Gebeliği devam edenler	3 (7,5)	5 (14,7)	
Patolojik nedenlerle sonlandırılmış gebelikler	11 (29,7)	17 (58,6)	,035**
Patolojik nedenlerle gebeliği sonlanmamışlar	26 (70,3)	12 (41,4)	

\* Pearson Ki-kare, \*\* Süreklilik Düzeltmeli Ki-kare, n: Hasta sayısı.

Grup 1 (SKDG) ve Grup 2 (STDG) gebelik durumuna göre karşılaştırıldı (Tablo 13, Şekil 9). Gruplar arasında biyokimyasal gebelik ve klinik gebelik açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,613-0,613$ ; Pearson Ki-kare).



**Şekil 9.** Gruplar arasında biyokimyasal (a) ve klinik gebeliklerin (b) karşılaştırması görülmektedir.



**Şekil 10.** Abortus, ektopik gebelik, fetal kardiyak aktivite yokluğu, anembriyonik gebelik nedenleri ile sonlandırılan gebeliklerin gruplara göre karşılaştırılması (a) ile canlı doğumların gruplara göre karşılaştırılması (b) görülmektedir.

Gebeliği patolojik nedenlerle (abortus, ektopik gebelik, FKA(-) D/C, anembriyonik gebelik D/C gibi) sonlanan hasta sayıları Şekil 10a'da görüldüğü gibi Grup 1'de (SKDG) anlamlı olacak derecede düşük bulundu ( $p=,039$ ; Pearson Ki-kare,  $p=0,035$ ; Süreklilik Düzeltmeli Ki-kare). Canlı doğum oranı Grup 1'de Grup 2'ye göre ( $p=0,039$ ; Pearson Ki-kare) anlamlı ölçüde yüksek bulundu (Şekil 10b).

**Tablo 14.** Gruplara göre fresh embriyo transferi

Fresh Transfer Durumu	Grup 1 (n <sub>1</sub> =111)	Grup 2 (n <sub>2</sub> =97)	P*
	n(%)	n(%)	
Transfer yapılmayan embriyo	12 (10,8)	13 (13,4)	,346
Transfer edilen embriyo grade**	91 (82,0)	72 (74,2)	
Transfer edilen embriyo morula, kompak	8 (7,2)	12 (12,4)	

\*Pearson Ki-kare, n: Sayı, \*\*Grade: 2Aa, 2Ab, 2Ac, 2Ba, 2Bb, 2Bc, 3Aa, 3Ab, 3Ac, 3Ba, 3Bb, 3Bc, 3Ca, 3Cc, 4Aa, 4Ab, 4Ac, 4Ba, 4Bb, 4Bc, 4Ca, 4Cb, 4Cc, 5Aa, 5Ab, 5Ba, 5Bb, 5Bc, 5Ca, 6Aa, 6Ba, Grade1, Grade2, Grade3.

SKDG ve STDG'de fresh transfer yapılan embriyo gradelerine göre karşılaştırıldı (Tablo 14). Gruplar arasında transfer edilen embriyo gradeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,346$ ; Pearson Ki-kare).

## 5. TARTIŞMA

Dünya sağlık örgütüne göre ‘Sağlık, sadece hastalık ve sakatlığın olmayışı değil, bedenen, ruhen, mental ve sosyal açıdan tam bir iyilik halidir’ cümleleriyle tanımlanır (27). Dünyada görülme sıklığı ortalama %8- %12 arasında olan infertilite yaklaşık olarak 186 milyon kişiyi etkilemektedir (52). Türkiye Nüfus Verileri Sağlık Araştırması (TNSA) 2018’e göre 15-49 yaş arası evli primer infertil kadın oranının % 4 olduğu görülmektedir. Eşlerinin de dahil edilmesiyle toplumdaki infertilite oranı artmaktadır (53). İnfertilite, üreme sağlığı problemlerinin yanında depresyon, kaygı ve duygusal sorunlar ile insan sağlığını tehdit etmektedir (34). Modern tıbbın ilerlemesi ile tüp bebek tedavisi infertilite için çözüm seçeneği olsa da bireysel sağlık harcamalarına ve ülke ekonomisine ciddi maddi yük getirmektedir (277-279). Tüm faktörler göz önüne alındığında infertilite tedavisinde temel amaç; en ideal, en iyi yardımcı üreme tekniğini kullanarak implantasyon başarısı ve gebelik oranlarını artırmak ve en kısa sürede çiftin sağlıklı bir bebeğe sahip olmasını sağlamaktır. Bu nedenle işlem, yöntem, tedavi protokollerini retrospektif olarak inceleyip en etkin sonuca en kısa sürede ve düşük maliyetle ulaşmaya ışık tutan bir çok çalışma vardır (280, 281).

Granüloza hücrelerinin oositi çevreyelen ve kümülüs hücreleri olarak adlandırılan bölümü, kendi aralarında gap junction adı verilen bağlantılar ile ilişki halindedir. Granüloza hücrelerinin oosite doğru olan uzantıları, oositin mikrovillusleri ile stoplazmik devamlılık yapmadan iç içe geçer. CC, oositin içine aminoasitler, nükleotidler, metabolitler ve birçok molekülün giriş çıkışını sağlar (162, 189, 190). Oositler, etraflarındaki somatik hücrelerle karşılıklı bir ilişki içinde büyür ve gelişim gösterir. Somatik hücreler mayotik duraksamada oositin beslenmesini ve daha sonra matürasyonunu sağlar (191, 192). Oositin zona pellusidası ve CC’nin uzantıları arasında gap junctionlar aracılığıyla çift yönlü etkileşim mevcuttur (193, 194, 282). GC ve CC oositin gelişimi ve büyümesini sağlarken, oositin salgılanan bazı faktörler de folikülün büyümesi ve GC’nin farklılaşmasını sağlar (195-197). CC, oosit gelişimi üzerinde; PTGS2, CAMK1D, HAS2, STC1, EFNB2 gibi bazı genler, EGF VE IGF-1 aracılığı ile etki gösterir (162, 283). Oosit tarafından sentezlenerek

GC'nin gelişimini sağlayan en önemli faktörlerden iki tanesi, büyüme-farklılaşma faktörü 9 (GDF9) ve kemik morfogenetik proteini 15'dir (BMP15) (284).

Literatür incelendiğinde, granüloza ve kümülüs hücrelerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma ile karşılaşılır.

Çalışmamızda, ICSI siklüsüne alınmış 157 hasta dosyası ve embriyoloji laboratuvar formu retrospektif olarak incelenmiştir. Rutin uygulamada rastlantısal olarak standart farklı pipet çapları ile yapılan klinik tecrübeye dayalı denudasyonun ICSI işlemi sonuçlarına yansımaları araştırılmıştır. Oosit çapı, antral folikül evresinde 125µm kadar gelişir. Granüloza hücrelerinden salınan OMI sayesinde büyüme durur. Fizyolojik siklüsde normal sekonder oosit gelişimi ise yaklaşık 150µm'yi bulabilir (162).

Bu çalışmada, kontrollü yumurtalık hiperstimülasyonu yapılan hastaların, oosit morfolometri ve morfolojisine 135µm ve 145µm çaplı pipetler ile denudasyonu yapılmış oositlerin verilerini karşılaştırılmıştır (285-287). SKDG ve STDG' de hasta, yaş, FSH, LH, E2, progesteron, prolaktin düzeyleri, folikül sayısı, folikül hacmi, toplanan oosit sayıları, ve folikül parametreleri açısından birbirine denk gruplar arasında araştırma yapılmıştır (p<0,05).

Granüloza ve kümülüs hücrelerinin, embriyo gelişimi üzerine etkileri ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunur. Oositin kümülüs hücreleri ile birlikte ko-kültüre edilmesinin embriyo kalitesini iyileştirdiği ve blastosist gelişme oranlarını artırdığı farklı çalışmalarla desteklenmiştir (15,16). Granüloza ve kümülüs hücrelerinin embriyo sayısı ve kalitesi üzerinde ki bu olumlu etkisi salgıladıkları çeşitli sitokinlere ve büyüme faktörlerine bağlanmıştır. Kümülüs hücreleri ile ko-kültüre edildikten sonra embriyoların CC ile birlikte transfer edilmesinin implantasyon oranlarını artırdığı gösterilmiştir (15, 199).

Granüloza ve kümülüs hücrelerinin oositin etrafında uzun süre kaldığı geç denudasyonda, OPU sonrası erken denudasyona kıyasla embriyo kalitesi ve blastosist oranlarının daha yüksek olduğu görülür. Bu durum kümülüs hücreleri oositin etrafında daha uzun süre kaldığında salgıladıkları çeşitli sitokin ve büyüme

hormonlarının etkisi ile oositin sitoplazmik matürasyonunu artırmasına bağlanmıştır (11).

Çalışmamızla çelişkili olarak Hassan ve arkadaşlarının 141 hasta ve 926 matürasyonunu tamamlamış M2 oosit üstünde benzer bir çalışma yapmıştır. Oositlerin CC ile kültüre edilmesi ve ICSI işlemi öncesi denude edilmesinin oositin nükleer ve sitoplazmik matürasyonunu olumlu etkilediğini göstermişlerdir (288). CC'nin embriyonik gelişim üzerine etkileri hala tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte CC'den salgılanan faktörlerin oositin sitoplazmik matürasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir (221, 222). CC yüzeyindeki sitoplazmik uzantıları ile oosit ile etkileşime girerek ooplazma içine çeşitli molekül ve hormonların geçişini sağlar. Bu etkileşimin oosit matürasyonunda etkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (194, 223-227).

Cındık ve arkadaşlarının infertil 40 kadından toplanan 180 immatür oosit üstünde yaptıkları çalışmada, CC' nin oositin IVM'ye pozitif etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Toplanan 180 immatür oositi iki gruba ayırdıkları çalışmada, birinci grupta CC'yi denude ederek uzaklaştırırken, ikinci gruptaki CC'yi koruyarak kültüre etmişlerdir. Kültüre edilen oositleri 4 saatlik periyotlarla 36 saat boyunca gözlemleyerek oositlerin matur oosite dönüşümlerini takip etmişlerdir. CC korunan grubun, matürasyonunu tamamlayan M2 oosit oranı % 60 iken; CC uzaklaştırılan grubun, M2 oosit oranının % 24,4 olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma ile Cındık ve arkadaşları oositin matürasyonunda CC'nin önemli bir rol üstlendiği sonucuna varmışlardır (289).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise CC'nin oosit matürasyonu, embriyo kalitesi, fertilizasyon ve blastosist oranları üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada *in vivo* koşullarda nükleer matürasyonunu tamamlayarak M2 safhasına geçen oositler kontrol grubuna alınmış ve immatür oositler ikiye ayrılmıştır. Grup A' da oositler denudasyon işlemi ile CC'den arındırılıp 24 saat kültüre edilirken, grup B'de oositler CC ile birlikte 24 saat kültüre edilmiştir. ICSI öncesi oosit denude edilerek CC'den temizlenmiştir. Araştırmacılar, nükleer matürasyon yönünden grup A ve grup B arasında fark görememişlerdir (290). Bizim çalışmamızda da Zhang ve arkadaşlarının ile uyumlu olarak SKDG' de oosit çevresinde kalan granüloza ve

kümürlüs hücrelerinin STDG'ye göre varsayılan etkileri açısından toplanan oosit sayısı, M1 oosit sayısı, M1'in toplam oosite oranı, M2 oosit sayısı, M2'nin toplam oosite oranı, GV oosit sayısı, GV'nin toplam oosite oranı, empty zona sayısı, empty zona sayısının toplam oosite oranında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir.

Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile embriyo gelişim oranları ve fertilizasyonud değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada *in vivo* M2 oositler kontrol grubu olarak sınıflandırılmışken, inmatür oositler Grup A' da CC'den denude edilerek ayrıştırıldıktan sonra, grup B'de CC ile birlikte 24 saat kültüre edilmiştir. Grup B daha geç olarak ICSI öncesi denude edilmiştir. Embriyo gelişim oranları grup A'da grup B'ye oranla daha az, kontrol grubunda A ve B grubundan fazla bulunmuştur. Altı ve daha çok blastomerli embriyo gelişim oranı; grup A'da grup B ile karşılaştırıldığında daha az, kontrol grubunda diğerlerinden fazla tespit edilmiştir. Blastosiste ulaşma oranının grup B'de, grup A'ya oranla yüksek olduğunu göstermişlerdir. CC ile oosit inkübasyonunun embriyo kalitesi ve gelişimi üzerine etkili olduğu sonucuna varmışlardır (290).

Bizim çalışmamızda ise diğer çalışmalarla çelişkili olarak gruplar (STDG, SKDG) arasında fertilizasyon sayıları, birinci gün normal fertilizasyon sayıları ve oranları açısından anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). SKDG ve STDG'deki embriyoların 6 gün boyunca *in vitro* yapılmış takiplerinin aynı günleri aralarında karşılaştırılmış ve gelişen embriyo sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). *In vitro* gelişimin ikinci günü Grup 1 ve Grup 2: Embriyo sayısı, fragmentasyon parametreleri, gelişim oranları ve gradelerine göre karşılaştırılmış, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). *In vitro* gelişimin üçüncü günü Grup 1 ve Grup 2, gelişim gününe uyumlu eşit boyutlarda ve sayıda blastomerlere sahip embriyo sayısı, fragmentasyon parametreleri, gelişim oranları ve gradelerine göre karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Gruplar arası günü ile uyumsuz blastomer sayısına ve boyutuna sahip üçüncü gün embriyo sayısının, toplam 3. gün embriyo sayısına oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0,037$ ). Denudasyonu 135µm'lik pipet ile yapılan oositlerden gelişen; blastomer

sayısı 3. gün embriyo blastomer sayısı ile uyumsuz embriyoların toplam 3. embriyolarına oranı, SKDG'na göre yüksek tespit edilmiştir. Bu sonuç denudasyonda 135µm'lik pipet kullanımı ile granüloza ve kümülüs hücrelerinin tam olarak uzaklaştırılmasına dayandırılabilir. Fakat fragmantasyon parametrelerinde ve blastomer morfolojilerinde istatistiksel anlamlı fark olmaması erken embriyonal gelişim oranlarında istatistiksel anlamlı fark oluşturmamıştır. Grup 1 (SKDG) ve Grup 2 (STDG) blastosist evresine kadar gelişebilen embriyo sayılarına göre karşılaştırıldığında, gruplar arasında erken embriyo gelişimi (iyi ve kötü evre (p=0,431 p=0,810 p=0,496 p=0,810) ve blastosist aşamasına ulaşabilen embriyo sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,301 p=0,695). Grup 1 ve Grup 2, günlere göre transfer edilen embriyo sayıları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,961 p=0,160 p=0,225 p=0,804 p=1,000 p=0,383 p=0,928 p=0,231). Çalışmamızda buraya kadarki veriler erken embriyonal gelişim ve blastosist aşamasına kadar embriyo gelişiminin morfolojik değerlendirmesinde kullanılan parametrelerdir. Embriyo transferinde iyi ve orta evrede embriyolar seçildiğinden transfer oranlarının karşılaştırması da embriyo gelişim oranları ile uyumludur. Denudasyonda 140µm'lik pipet kullanımı sonucu oosit etrafında kalan granüloza kümülüs hücrelerinin varsayılan etkisi literatür bilgilerinin aksine, erken embriyonal gelişim ve blastosist aşamasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Literatürde oosit dejenerasyon verileri 'ICSI sonrası dejenerasyonu' olarak verilmiştir. Bu sonuçlarda; denudasyon kaynaklı hasar sonucu dejenerasyon, ICSI işlemi mekanik mikromaniplasyon sonucu muhtemel dejenerasyondan ayırt edilemez. Hu ve arkadaşları, 35 yaşın altında 488 ICSI siklusünü retrospektif olarak incelemiştir. ICSI sonrası dejenerasyon verileri ile canlı doğum oranını öngörmekte anlamlı sonuca ulaşamamışlardır (292). Liu ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif diğer bir çalışmada, ICSI sonrası dejenere oosit içeren grup (255 siklus) ve dejenere oosit içermeyen gruplar (243 siklus) incelenmiştir (293). Dejenerasyon grubunda embriyo gelişim kalitesi düşmüş olarak izlense de iki grup arasında gebelik oranı, implantasyon oranı ve abortus oranlarında anlamlı fark görülmemiştir (292, 293). Bu çalışmada da ICSI işlemi sonrası dejenerasyon verileri kullanılmıştır (293). Rosen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ICSI sonrası oosit dejenerasyonu araştırılmıştır.

Dejenerasyonda, ICSI ve denudasyon teknisyenin, yumurtalık stimülasyonu yapan hekimin etkili olmadığı, doğal oosit kalitesi sonucu dejenerasyon görülebileceği sonucuna varılmıştır (294). Tüm bu çalışmalardan bizim çalışmamızı ayrıcalıklı kılan, denudasyon işlemi sonrası oosit dejenerasyon (denudasyona spesifik dejenerasyon) verilerinin gruplar arası karşılaştırılmış olmasıdır. STDG'nin dejenere oosit sayısı ve dejenere oosit sayısının toplam oosit sayısına oranının SKDG'ye göre anlamlı olacak şekilde yüksek bulunması:135µm'lik pipet ile tam denudasyonda oosit hasarının yüksek olduğu yönünde yorumlanabilir (14, 291-294).

ICSI döngüleri, denudasyon sonrası embriyo morfolojisi ve blastokist gelişimi açısından, incelendiğinde: Ebner ve arkadaşları prospektif olarak 57 infertil hasta kardeş COC üzerinde çalışma yapmışlardır. Kısmi (n = 314) ve tam (n = 336) denudasyona göre modelleme yapılmıştır. Kısmi denudasyon sonucu M2 oositler kendi içinde Tip A ve B olarak ikiye ayrılmıştır. Tip A (n= 202) belirgin CC kümesinden oluşurken Tip B (n= 75) daha homojen dağılım gösteren CC'nin bulunduğu oositlerden oluşmuştur. Kısmi ve tam denudasyon gruplarının immatür oositleri 24 saat kültüre edilmiştir. Kısmi denudasyonda ikinci gün embriyo gelişimi ve iyi kalite blastosist gelişimi anlamlı yüksek bulunmuştur. CC dağılımına göre tip B' de kaliteli blastosist oranı yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada implantasyon ve gebelik, bağımsız transfer yapılamayıp karma transfer yapılmış olması nedeniyle değerlendirilememiştir (14).

Benkhalifa ve arkadaşlarının 432 infertil hasta üzerinde yaptığı prospektif çalışmada hasta oositleri ICSI sonrası otolog kümülüs hücreleri ile kültüre edilmiştir. Üçüncü gün ile 5 ve 6. gün gebelik ve implantasyon oranları arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Embriyo seçimi ve implantasyon iyileştirmesi için faydalı olabileceğini göstermişlerdir (295).

Kümülüs hücrelerinin implantasyon ve gebelik üzerine etkilerini araştıran literatürdeki başka bir çalışma da; 517 infertil kadın hasta oositleri çalışmaya alınmıştır. ICSI sonrası yaklaşık 30 µL otolog kümülüs hücreleri ile kültüre edilmiştir. otolog kümülüs hücreleri ile transferi yapılmış hastalar çalışma grubu (grup A), kümülüs hücreleri ile kültüre edilmiş ve transferde bu hücrelerin kullanılmadığı grup kontrol grubu (grup B) olarak sınıflandırılmış (296).

Çalışma grubunda %25.6'lık implantasyon izlenirken, kontrol grubunda %14,5'lik bir oran tespit edilmiştir. Gebelik açısından ise; çalışma grubunda 47.6'lık gebelik oranı izlenirken kontrol grubunda %34'lük gebelik tespit edilmiştir. Kümüls hücrelerinin, embriyonik gelişime katkı sağladıklarını, implantasyon ve gebelik başarısını pozitif yönde arttırdıklarını tespit etmişlerdir (15, 16, 199, 296).

Uygulanmış kısmi ve tam denudasyonun sonuçlarının incelendiği bizim çalışmamızda; gruplar arasında 2. gün embriyo sayısı ve evresi, gelişim gününe uyumlu eşit boyutlarda ve sayıda blastomerlere sahip embriyolar ile fragmentasyon parametleri, erken embriyo gelişimi ve blastosist aşamasına ulaşabilen embriyo sayıları, günlere göre transfer edilen embriyo sayıları, biyokimyasal ve klinik gebelik durumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Gebeliği patolojik nedenlerle (abortus, ektopik gebelik, FKA(-) D/C, anembriyonik gebelik D/C gibi) sonlanan hasta sayıları; 140µm çaplı pipet ile denudasyonu yapılarak oosit çevresinde granüloza hücrelerinin bırakıldığı grupta düşük bulundu. Buna ek olarak anlamlı ölçüde canlı doğum oranının SKDG'de yüksek bulunması, oosit etrafındaki bu sınırlı sayıda granüloza ve kümülüs hücrelerinin sağlıklı doğuma moleküler düzeyde katkısı olduğu yönünde bir sonuçtur. Gelişen 3. gün embriyoları arasında günü ile uyumsuz blastomer sayısına sahip olanların oranı SKDG'de anlamlı düşüktür. Literatür ile uyumlu bir sonuç olarak, granüloza hücrelerinin oosit çevresinde kaldığı grupta, hücrelerin iyi blastomer gelişimini destekleme yönünde olsada embriyo sınıflandırılmalarına yansımamıştır. Bu durum oosit etrafında kalan granüloza hücrelerinin sayısının az olmasından dolayı kısa dönem morfolojik gelişim üzerine etkilerinin gözlenememesinden kaynaklı olabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmamızda ICSI uygulanan 157 infertil hasta dosyası ve embriyoloji laboratuvar formu retrospektif olarak incelenmiştir. Rutin uygulamada, rastlantısal olarak standart farklı pipet çapları ile klinik tecrübeye dayalı denudasyon yapılmaktadır. Denudasyon sonrasında oosit etrafında kalan granüloza hücrelerinin ICSI işlemi sonuçlarına olası etkileri geriye dönük araştırılarak istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir.

- SKDG ve STDG' de hasta, yaş, FSH, LH, E2, progesteron, prolaktin düzeyleri, folikül sayısı, folikül hacmi, toplanan oosit sayıları, ve folikül parametreleri açısından birbirine denk gruplar arasında araştırma yapılmıştır.
- SKDG' de oosit çevresinde kalan granüloza ve kümülüs hücrelerinin STDG'ye göre varsayılan etkileri açısından toplanan oosit sayısı, M1 oosit sayısı, M1'in toplam oosite oranı, M2 oosit sayısı, M2'nin toplam oosite oranı, GV oosit sayısı, GV'nin toplam oosite oranı, empty zona sayısı, empty zona sayısının toplam oosite oranında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir. 140µm çaplı pipet ile denudasyon sonucu oosit çevresinde kalan granüloza hücrelerinin matürasyon üzerine anlamlı etkisi tespit edilmemiştir.
- Granüloza ve kümülüs hücrelerinin, embriyo gelişimi üzerine etkileri incelendiğinde: Birinci gün normal fertilizasyon sayıları ve oranları ile erken embriyonal gelişim, transferler ve blastosist aşamasına kadar embriyo gelişiminin morfolojik değerlendirmesinde kullanılan parametrelerde anlamlı fark tespit edilmemiştir.
- Tam denude edilen oositlerden gelişen 3. gün embriyo blastomerleri arasında günü ile uyumsuz blastomerlerinin anlamlı yüksek oluşu, granüloza ve kümülüs hücrelerinin embriyo gelişimini olumlu etkilediği yönünde bir sonuç olsa da embriyo evrelendirmelerimizde anlamlı sonuçlar oluşturmamıştır.
- Tam denude edilen oositlerden oluşan grupta (STDG) dejenere olan oosit oranı anlamlı yüksek bulunmuştur.
- Embriyo morfolojisi ve blastokist gelişimi açısından tam (STDG) ve kısmi (SKDG) denudasyon grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir.

- Tam denude edilen oositlerden oluşan grupta (STDG), patolojik nedenlerle gebeliği sonlanan hasta sayıları anlamlı yüksek bulunmuştur.
- Oosit çevresinde kalan granüloza ve kümülüs hücrelerinin bulunduğu grupta (SKDG) canlı doğum oranı anlamlı yüksek bulunmuştur.
- Çalışmamızın retrospektif olması, denudasyon sırasında al-ver sayısına müdahale imkanımızın olmayışı ve bir yıllık zaman dilimindeki verileri içermesi nedeniyle sınırlayıcı yönümüzdür. Günümüzde sabit çap açıklığına sahip flexi pipetlerle yapılabilen denudasyon tekniği sonuçları çalışmamızda incelenmiştir. Bu pipetlerle yapılan denudasyonlarda granüloza hücre sayısı standardize edilebilir. Ek olarak denudasyon işlemi sonrası, oosit dejenerasyon verilerinin gruplar arası karşılaştırılmış olması standart pipetlerin denudasyona spesifik hasarına ışık tutar. Çalışmamızın retrospektif olmasının olumlu yanı denudasyonun canlı doğum oranı üzerine etkilerini görebilmemizdir. Bunlar çalışmamızı mevcut çalışmalardan farklı kılan yönlerimizdir.
- Prospektif bir çalışma planında, ICSI'nin uygulanabilirliği ölçüsünde, denudasyon sonrası maksimum sayıda hücre bırakılarak, standardize edilmiş granüloza hücreleri ile oosit matürasyon ve embriyo gelişimi üzerine morfolojik etkilerin izlenebileceğini düşünmekteyiz. Daha çok oosit sayısına sahip hastaların olduğu başka bir prospektif çalışma planlanarak kardeş oositler arasında granüloza ve kümülüs hücreleri etkinliğinin incelenmesinin çok daha objektif sonuçlar elde edilmesinde literatüre ve tıp bilimine katkı sağlayacağı kanısındayız.

## 7. KAYNAKLAR

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015; 103(6):44-50.
2. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med* 1995; 333:1517-21.
3. Guttmacher AF. Factors affecting normal expectancy of conception. *J Am Med Assoc* 1956; 161(9):855-60.
4. Aktoz F, Mümüşoğlu S. Kadın hastaya yaklaşım ve kadın infertilitesi nedenleri, tanı yöntemleri. In: Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları. Ed. Karakoç L ,Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, 2019; 137-47.
5. Özten G, Bozdağ G. Erkek hastaya yaklaşım ve erkek infertilitesi nedenleri, tanı yöntemleri. In: Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları. Ed. Karakoç L ,Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, 2019; 143-8.
6. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. İkinci Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2016; 289-354.
7. Pierson RA. IVF’te ultrasogografi. İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 81-104.
8. Nagy ZP. Yardımcı üreme. In: İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 143-167.
9. Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R, Cerulo G, Greo E. Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13(4):1014-9.
10. Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Steirteghem AV. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 1996; 65(5):1047-50.
11. Mizuno S, Ishikawa Y, Matsumoto H, Sato M, Ida M, Fukuda A, Morimoto Y. The timing of cumulus cell removal for intracytoplasmic sperm injection

- influences the capability of embryonic development. *Reprod Med Biol* 2018; 18(1):111-7.
12. Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1995; 40(3):338–44.
  13. Ozenci CC, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004; 19(9):2052–9.
  14. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Shebl O, Tews G. Incomplete denudation of oocytes prior to ICSI enhances embryo quality and blastocyst development. *Hum Reprod.* 2006; 21(11):2972-7.
  15. Parikh FR, Nadkarni SG, Naik NJ, Naik DJ, Uttamchandani SA. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006; 86(4):839–47.
  16. Cihangir N, Gorkemli H, Ozdemir S, Aktan M, Duman S. Influence of cumulus cell coculture and cumulusaided embryo transfer on embryonic development and pregnancy rates. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2010; 11(3):121–6.
  17. Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 1996; 65(5):899-908.
  18. Sauerbrun-Cutler MT, Huber WJ, Has P, Shen C, et al. Is intracytoplasmic sperm (ICSI) better than traditional in vitro fertilization (IVF): confirmation of higher blastocyst rates per oocyte using a split insemination design. *J Assist Reprod Genet* 2020; 37(7):1661-7.
  19. Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001;30; 357(9274):2075-9.
  20. van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, et al. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertil steril* 2006; 85(2):395-400.

21. Silber SJ, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P, Asch RH. Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N Engl J Med* 1990; 27; 323(26):1788-92.
22. Velheyn G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, et al. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14(9):2313-9.
23. Infertility definitions and terminology. <https://www.who.int/teams/sexual-and-reproductive-health-and-research/areas-of-work/fertility-care/infertility-definitions-and-terminology> adresinden 15/04/2021 tarihinde erişilmiştir.
24. Delilbaşı L. İnfertilite ve infertilite tedavileinin tarihçesi. In: İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Ed. Delilbaşı L. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008;1-30.
25. Aydos K. Üremenin evrimi, tarihçesi ve felsefesi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;157-74.
26. Cobb M. Üreme Cinsellik, Yaşam ve Büyümenin Gizemlerini Çözen 17. Yüzyıl Bilim İnsanları. 1-2. Basım, İstanbul, Everest Yayınları, 2009; 1-357.
27. World Health Organization. Basic Documents, Forty-Fifty edition, Supplement, October 2006. [www.who.int](http://www.who.int) adresinden 20/03/2021 tarihinde erişilmiştir.
28. Oakley L, Doyle P, Maconochie N. Lifetime prevalence of infertility and infertility treatment in the UK: results from a population-based survey of reproduction. *Hum Reprod* 2008;23:447-50.
29. Dündar C. Dünyada ve Türkiye’de infertilite epidemiyolojisi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;177-98.
30. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, et al. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod* 2008;14:605-21.
31. Kraft AD, Palombo J. The psychological dimensions of infertility. *Journal of Orthopsyc* 1986;50,618-27.

32. Matthews R, Matthews AM. Beyond the mechanics of infertility. *Family Relations* 1986;35,470-87.
33. Spencer L. Male infertility: psychological correlates. *Postgrad Med* 1987;81, 223-8.
34. Matsubayashi H, Hosaka T, Izumi S, Suzuki T, Makino T. Emotional status in infertile women in Japan. *Hum Reprod* 2001; 16(5):966-9.
35. Bozkurt O, Özkan M. İnfertilite ve tedavi süresinin kadınlar üzerinde psikiyatrik etkileri. *JMS* 2019; 10:48-55.
36. Domar AD, Broome A, Zuttermeister PC, Seibel M, Friedman R. Prevalence of depression in infertile women. *Fertil Steril* 1992; 58 (6):1158-63.
37. Örnek SV. Türk Halk bilimi. *Kültür Bakanlığı Yayınları* 2000; 1.
38. Ulbrich PM, Coyle AT, Labre MM. Involuntary childlessness and marital adjustment: his and hers. *Journal & Marital Therapy* 1990; 16(3):147-58.
39. Acıpayamlı O. Türkiye’de Doğumla İlgili Adet ve İnanmaların Etnolojik Etüdü. Ankara, Atatürk Üniversitesi Yayınları 1974; 1-172.
40. Daar AS, Maerali Z. Infertility and assisted reproductive technologies in the developing world. In: Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction: Report of a Meeting on Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction. World Health Organization, Geneva. 2002; 15-30.
41. Morice P, Josset P, Dubuisson JB. History of sterility in ancient times. *Contracept Fertil Sex* 1995; 23(6):423-7.
42. Oğuz HD. İnfertilite tedavisi gören kadınlarda infertilitenin ruh sağlığına, evlilik ilişkileri ve cinsel yaşama etkileri. Yayımlanmamış uzmanlık tezi, İstanbul 2004. [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/ruh\\_sag\\_hast/dr\\_havva\\_deniz\\_oguz.pdf](http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/ruh_sag_hast/dr_havva_deniz_oguz.pdf) adresinden 20/03/2021 tarihinde erişilmiştir.
43. Vayena E, Rowe P, Griffin PD. Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting. *Progress* 2003; 63:1-8.
44. Fraenkal L. Die funktion des corpus luteum. *Archiv für gynakologie* 1903; 68:438-545.
45. Butenandt A, Schmidt J. Überführung des pregnandiols in corpus luteum hormon. *Chemistry Europe* 1934; 67(11):1901-4.

46. Healy MW, Hill MJ, DeCherney A. IVF: ilk kırk yıl. In: İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019;1-16.
47. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1890; 48:457-9.
48. Heape W. Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1897; 62:178-83.
49. Menkin MF, Rock J. In Vitro Fertilization and Cleavage of Human Ovarian eggs. 100. American Association for the Advancement of Science, 1944; 105-7.
50. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lanset* 1978; 2(8085):366.
51. Türkiye'de ki Tüp Bebek Merkezleri. <https://www.tsrn.org.tr/pro/konu/harita/index.htm> adresinden 13/04/2021 tarihinde erişilmiştir.
52. Borght MV, Wyns C. Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018; 62:2-10.
53. 2018 Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü Ankara, Türkiye. [http://www.hips.hacettepe.edu.tr/tnsa2018/rapor/TNSA2018\\_ana\\_Rapor.pdf](http://www.hips.hacettepe.edu.tr/tnsa2018/rapor/TNSA2018_ana_Rapor.pdf) adresinden 15/04/2021 tarihinde erişilmiştir.
54. Gürkan T, Demirel A. İnfertil çiftin değerlendirilmesi. In: Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. Ed. Çolgar U. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006;79-89.
55. Çivi S. İnfertilite epidemiyolojisi. In: Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite. Ed. Çiçek MN. Ankara, Palme Yayınları, 2008; 1-10.
56. Günalp S, Yücel A. Erkek infertilitesi tanı ve tedavi. In: Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. Ed. Çolgar U. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006;91-108.
57. Ahmad A, Ahmed A, Patrizio P. Cystic fibrosis and fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013; 25(3):167-72.
58. Baydili N, Demirtaş A, Ekmekçiöğlü O. Klinefelter Sendromu. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ,

- Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 699-712.
59. Güneş S, Aşçı R. Erkek infertilitesine yol açan diğer kromozomal hastalıklar. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 713-32.
60. Aşçı R. Subfertil erkeğin değerlendirilmesi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 199-214.
61. Ersay AR, Alan C, Reşorlu B. Üremeyi etkileyen genital anomaliler. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 11-20.
62. Dávila Garza SA, Patrizio P. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and 'stump' tail sperm: an updated literature review. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013; 25(3):229-46.
63. Orhon E. Erkek infertilitesi. In: Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite. Ed. Çiçek MN. Ankara, Palme Yayınları, 2008; 109-48.
64. Adayener C, Malkoç E. Kronik hastalıklar ve fertilite. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;747-59.
65. Başal Ş, Demirer Z. Spinal kordon yaralanmalı infertile olguda tanı ve tedavi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 569-80.
66. Öztürk E, Soygür T. İnmemiş testis ve fertilite. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 741-5.

67. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, et al. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur. Urol* 2012; 62(2):324-32.
68. Künzle R, Mueller M, Hanggi W, et al. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil. Steril* 2003; 79 (2):287-91.
69. Sharpe RM. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci* 2010; 365(1546):1697-712.
70. Ayyıldız A, Benli E. İlaçlar ve infertilite (kemoterapötikler) ve diğer ilaçların erkek üreme sistemine etkisi-tedavi olanakları. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 779-804.
71. Özdedeli K, Arda E. Antisperm antikorlar ve infertilite. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 295-306.
72. Gözükara KH, Bozlu M. Fertiliteyi etkileyen genital yaralanmalar. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 732-40.
73. Kadıhasanoğlu M, Kendirci M. Yaşam biçimi ve infertilite. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 761-78.
74. Jozkow P, Rossato M. The impact of intense exercise on semen quality *Am J Mens Health* 2017; 11(3):654-62.
75. Semet M, Paci M, Saias-Magnan J, Guillemain-Metzler C, Boisser R, et al. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology* 2017; 5(4):640-63.
76. Jozkow P, Medras M. Psychological stress and the function of male gonads. *Endokrynol. Pol* 2012; 63(1):44-9.
77. Büyükalpelli R. Kanser ve erkek infertilitesi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö,

- Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 817-30.
78. Franks S. Polycystic ovary syndrome in adolescents *Int J Obes* 2008; 32(7):1035-41.
  79. Yaralı H, Demirtaş E. Polikistik over sendromu. In: Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. Ed. Çolgar U. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006; 249-59.
  80. De Rosa M, Zarrilli S, Di Sarno A, Milano N, Gaccione M, et al. Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. *Endocrine* 2003; 20(1-2):75-82.
  81. Smith PB, Phillips LE, Faro S, McGill L, Wait RB. Predominant sexually transmitted diseases among different age and ethnic groups of indigent sexually active adolescents attending a family planning clinic. *J Adolesc Health Care* 1988; 9(4):291-5.
  82. Sallam HN, Ritzk B. The tubal factor in infertility. In: Clinical Infertility and In Vitro Fertilization. Ed. Rizk BRMB, Sallam HN. New Delhi, Jaypee Borthers Medical Publishers, 2012; 105-21.
  83. Arıcı A. Endometriyozis. In: Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. Ed. Çolgar U. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006; 109-29.
  84. Sallam HN, Rizk B. The cervical factor in infertility. In: Clinical Infertility and In Vitro Fertilization. Ed. Rizk BRMB, Sallam HN. New Delhi, Jaypee Borthers Medical Publishers, 2012; 96-104.
  85. Sallam HN, Rizk B. The uterine factor in infertility. In: Clinical Infertility and In Vitro Fertilization. Ed. Rizk BRMB, Sallam HN. New Delhi, Jaypee Borthers Medical Publishers, 2012; 126-34.
  86. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun* 2012; 38(2-3):266-74.
  87. Bellver J, Donnez J. Introduction: infertility etiology and offspring health. *Fertile Steril* 2019; 111(6):1033-5.
  88. Hart RJ. Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics. *Physiol. Rev* 2016; 96(3):873-909.

89. ESHRE Capri Workshop Group. Nutrition and reproduction in women. *Hum Reprod Update* 2006; 12(3):193-207.
90. Di Fede G, Mansueto P, Longo RA, Rini G, Carmina E. Influence of sociocultural factors on the ovulatory status of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2009; 91(5):1853-6.
91. Merkin SS, Azziz R, Seeman T, Calderon-Margalit R, Daviglus M, Kiefe C, et al. Socioeconomic status and polycystic ovary syndrome. *J Women's Health (Larchmt)* 2011; 20(3):413-9.
92. Özdemir S, Görkemli H. İnfertil hastaya yaklaşım. In: Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite. Ed. Çiçek MN. Ankara, Palme Yayınları, 2008; 101-8.
93. Dubin L, Amelar RD. Sexual causes of male infertility. *Fertil Steril* 1972; (2388):579-82.
94. Levitas E, Lunenfeld E, Weiss N, Friger M, et al. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertil Steril* 2005; 83(6):1680-6.
95. Balasch J. Investigation of the infertile couple: investigation of the infertile couple in the era of assisted reproductive technology: a time for reappraisal. *Hum Reproduction* 2000; 15(11):2251-7.
96. Türk Üroloji Derneği. WHO Laboratuvar El Kitabı. İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlemlerden Geçirilmesi. Ed. Kadioğlu A. Beşinci Basım. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2010; 7-271.
97. Aktan G. Semen analizi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 321-346.
98. Temiz MZ, Kandıralı E, Semerciöz A. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 347-58.

99. Kuruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization *Fertile steril* 1988; 49(1):112-7.
100. Hoffmann N, Haider SG. New results in the morphologic diagnosis of spermatogenesis disorders *Gynakologe* 1985; 18(2):70-80.
101. Can C, Turgut M. İnfertile açısından erkeğin genel olarak değerlendirilmesi. In: İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. Ed. Hassa H. Eskişehir, Osmangazi Üniversitesi Yayınları, 2003; 139-46.
102. Gülgün E. Erkek infertilitesinde görüntüleme. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 275-88.
103. Kılıçaslan I, Uysal V. Testis biyopsilerinin değerlendirilmesi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 307-18.
104. Koyuncu H, At Ö, Yencilek F. Erkek ileri infertilite testleri. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 377-90.
105. Gülüm M, Yeni E. Sperm sayısı azalıyor mu?. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 439-49.
106. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years *BMJ* 1992; 305(6854):609-13.
107. Splingart C, Frapsauce C, Veau S, Barthelemy C, Royere D, Guerif F. Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *Int J Androl* 2012; 35(3):467-74.
108. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* 2000; 108(10):961-6.

109. History of ASRM. <https://www.asrm.org/about-us/history-of-asrm> adresinden 28.08.2021 tarihinde erişilmiştir.
110. Galliano D, Pellicer N, Pellicer A. Over rezerv testleri. In: *İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 43-54.
111. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 217(2):129-40.
112. Turhan NÖ, Aker A. Ovarian rezerv testleri. In: *Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite*. Ed. Çiçek MN. Ankara, Palme Yayınları, 2008; 89-100.
113. Meldrum DR. İnfertil çiftin in vitro fertilizasyon için değerlendirilmesi ve hazırlanması. In: *İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 17-28.
114. Devroey P, Fauser BCJM, Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update* 2009; 15(4):391-408.
115. Vicdan K, Işık AZ. *İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar*. Birinci baskı. Ankara, Çağdaş Medikal Kitabevi, 1999; 15-24.
116. Şahin G, Göker ENT, Akdoğan A, Tavmergen E. İntrauterin inseminasyon (IUI) sikluslarında ovulasyon indüksiyonu. *TJRMS* 2017; 1(1):36-41.
117. Tanahatöe SJ, Broekmans FJM, Fauser BCJM. Ovaryan stimülasyonun temelleri. In: *İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 55-72.
118. Elder K, Dale B. Üremenin endokrin kontrolü: YÜT için kontrollü ovaryum hiperstimülasyonu. *İn-Vitro Fertilizasyon*. Ed. İrez T Üçüncü Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2014; 19-27.
119. Çiçek MN, Mollamahmutoğlu L. Oosit toplama prosedürü (OPU; oocyte pick up). In: *A'dan Z'ye Yardımcı Üreme Teknikleri*. Ed. Çiçek MN, Mollamahmutoğlu L. Ankara, Palme Yayınları, 2009; 177-89.
120. D'Angelo A, Panayotidis C, Amso N, Marci R, Matorras R, Onofriescu M, et al. Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up. *Hum reprod* 2019; 19(4):025.

121. Tobler KJ, Zhao Y, Weissman A, Majumdar A, Leong M, Shoham Z. Worldwide survey of IVF practices: trigger, retrieval and embryo transfer techniques. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 290(3):561-8.
122. Kumaran A, Narayan KP, Pai PJ, Ramachandran A, Mathews B, Adiga SK. Oocyte retrieval at 140-mmHg negative aspiration pressure: A promising alternative to flushing and aspiration in assisted reproduction in women with low ovarian reserve. *J Hum Reprod Sci* 2015;8(2):98-102.
123. Delilbaşı L, Karabulut O. Oogenezis, oosit toplama prosedürü, oosit morfolojisi ve in vitro matürasyon. In: *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. Ed. Delilbaşı L. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008; 85-104.
124. Delilbaşı L. Oosit matürasyonu ve morfolojisi. *Klinik Embriyoloji Uygulamaları Atlası*. Ankara, Büyük Harf Tıp Yayınları, 2010; 1-30.
125. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online* 2006; 12(4):507-12.
126. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1999; 14(7):1859-63.
127. Combelles CMH, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod*. 2002; 17(4):1006-16.
128. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002; 124(2):181-96.
129. Jaroudi K, Al-Hassan S, Al-Sufayan H, Al-Mayman H, Qeba M, Coşkun S. Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization are complementary techniques in management of unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20(9):377-81.
130. Nagy ZP, Joris H, Liu J, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Intracytoplasmic single sperm injection of 1-day-old unfertilized human oocytes. *Hum Reprod*. 1993; 8(12):2180-4.
131. Humaidan P, Bredkjaer HE, Westergaard LG, Andersen CY. 1,500 IU human chorionic gonadotropin administered at oocyte retrieval rescues the luteal phase

- when gonadotropin-releasing hormone agonist is used for ovulation induction: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2010; 93(3):857-54.
132. Humaidan P, Bredkjaer HE, Bungum L, Bungum M, Grøndahl ML, LWestergaard L, Andersen CY. GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2005; 20(5):1213-20.
133. Trounson A, Gardner DK, Handbook of In Vitro Fertilization. Boca Raton; CRC Press, 1993, 1-324.
134. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992; 340(8810):17-8.
135. Dozortsev D, Nagy P, Abdelmassih S, Oliveira F, Brasil A, Abdelmassih V, et al. The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropin. *Fertile Steril* 2004; 82(6):1492-6.
136. Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod* 1998; 1:76-86.
137. Sathananthan AH, Szell A, Ng SC, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Trounson A. Is the acrosome reaction a prerequisite for sperm incorporation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI)? *Reprod Fertil Dev* 1997; 9(7):703-9.
138. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, et al. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod* 1995; 10(12):3171-7.
139. Sökmensüer LK, Delilbaşı L. Fertilizasyon. In: *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. Ed. Delilbaşı L. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008; 105-15.
140. Enginsu E, Pilavcı NK. Spermatogenezis, erkek infertilitesinde tanıya yönelik testler ve sperm hazırlama protokolları. In: *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. Ed. Delilbaşı L. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008; 61-83.

- 141.Özkavukçu S, Aras D. IUI ve IVF için sperm hazırlama yöntemleri. *TJRMS* 2017; 1(2): 92-8.
- 142.Delilbaşı L. Fertilizasyon. İn: Klinik Embriyoloji Uygulamaları Atlası. Ankara, Büyük Harf Tıp Yayınları, 2010; 127-69.
- 143.Akçay CN, Karakoç Sökmensüer L. Fertilizasyon dinamiği, fertilizasyonun değerlendirilmesi, total fertilizasyon defekti. İn: Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları. Ed. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, 2019; 95-108.
- 144.Huret JL. Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Archives of Andrology* 1986; 16(2):97-109.
- 145.Yılmaz S. Embriyo seçim kriterleri. İn: İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Ed. Delilbaşı L. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2008; 183-98.
- 146.Scott L, Fiin T, O’Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007; 22(1):230-40.
- 147.Ergin EG, Erfidan ZÖ, Aydın G. Embriyoların statik ve dinamik değerlendirme yöntemleri, evrelendirilmeleri. İn: Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları. Ed. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, 2019; 205-17.
- 148.Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14(5):1318-23.
- 149.Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod* 1999; 14(10):2588-95.
- 150.Gardner DK, Montag M. İnsan embriyo gelişimi ve canlılığının değerlendirilmesi. İn: İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2019; 181-204.

151. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; 26(6):1270-83.
152. Balaban B. Fertilizasyonun değerlendirilmesi. In: *İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 169-80.
153. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril*. 2000; 74(2):282-7.
154. Langley MT, Marek DM, Gardner DK, Doody KM, Doody KJ. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Hum Reprod* 2001; 16(5):902-8.
155. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocysts stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 11(7): 2118.
156. Lalitkumar S, Gomez E, et al. Endometriyal reseptivite. In: *İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 317-30.
157. Menezo Y, Chouteau J, Veiga A. In vitro fertilization and blastocyst transfer for carriers of chromosomal translocation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001; 96(2):193-5.
158. Bosch E. Çoğul gebeliklere karşı tekil gebelikler: sonuçlar ve önlemler. In: *İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 343-52.
159. Mariani G, Bellver J. Embriyo transferi. In: *İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı*. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 331-42.
160. Ayas B. Embriyo transfer tekniği. In: *Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları*. Ed. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, 2019; 219-24.

- 161.Elder K, Dale B. İmplantasyon ve fetal gelişimin ilk evreleri. İn-Vitro Fertilizasyon. Ed. İrez T. Üçüncü Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2014; 82-92.
- 162.Ross MH, Pawlina W. Dişi üreme sistemi. In: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Ed. Baykal B. Altıncı Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2014;830-95.
- 163.Mete GA. İmplantasyon: embriyo ve endometriyumun karşılıklı roller. In: Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları. Ed. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E. Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, 2019; 109-35.
- 164.Cobo A. Oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu. In: İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 273-90.
- 165.Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et. al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance.Hum Reprod update. 2017; 23(2):135-55.
- 166.Korkmaz C, Baykal B. İnsan embriyo gelişiminde kullanılan kültür ortamları. In: İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Ed. Delilbaşı L. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008; 257-70.
- 167.Gardner DK, Lane M. Embriyo kültür sistemleri. In: İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 205-44.
- 168.Kumtepe Y, Kıran H, Tokat ZG, Kendirci AÇ, Çetin MT. Yardımcı üreme tekniklerinde ko-kültür kullanımı. *DergiPark Şerefeddin Sabuncuoğlu* 2007; 16:235-43.
- 169.Walls ML, Hart R. Klinik kullanım için in vitro matürasyon. In: İn Vitro Fertilizasyon El Kitabı. Ed. Gardner DK, Simon C. Dördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019;115-30.
- 170.Kırıcı Y, Yıldız S. Erkek üreme sistemi anatomisi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö,

- Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;21-8.
- 171.Sadler TW. Ürogenital sistem. In: Langman Medikal Embriyoloji. Ed. Başaklar AC. Onüçüncü Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2017;250-77.
- 172.Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Ürogenital sistem. In: Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Ed. Dalçık H. Onuncu Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2016;260-82.
- 173.Solakoğlu S. Ürogenital sistemin gelişimi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşcı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;3-10.
- 174.Evolution Of Sex Chromosomes: The Case Of The White Champion. <https://www.sciencedaily.com/releases/2005/02/050201112231.htm> adresinden 26/04/2021 tarihinde erişilmiştir.
- 175.Özenci ÇÇ. Spermatogenezin moleküler düzenlenmesi ve erkek fertilitesi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşcı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;55-78.
- 176.Ross MH, Pawlina W. Erkek üreme sistemi. In: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Ed. Baykal B. Altıncı Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2014;784-829.
- 177.Eroschenko VP. Erkek üreme sistemi In: diFiore'nin Histoloji Atlası. Ed. Demir R. Onikinci Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2016;477-504.
- 178.Mescher AL. Erkek üreme sistemi. In: Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas. Ed. Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS. Ondördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019; 439-59.
- 179.Karagüzel E. Leydig hücresi ve işlevleri. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşcı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;79-86.
- 180.Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87(1):1-26.

181. Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 2006; 38(12):1430-4.
182. Orth JM, Qiu J, Jester WF Jr, Pilder S. Expression of the c-kit gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes in vitro. *Biol Reprod* 1997; 57(3):669-83.
183. Aşçı R. Epididim işlevleri ve regülasyonu. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Ed. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Birinci baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013; 101-22.
184. Çayan S, Ayyıldız A. Türk Androloji Derneği. Çevrenin Erkek Cinsel ve Üreme Sağlığına Etkisi ve Korunma Yolları. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2010; 1-352.
185. Gambone JC, Moore JG. Kadın üreme sistemi, anatomisi ve embriyolojisi. In: Obstetrik Jinekolojinin Temelleri. Ed. Üstün C, Koçak İ. Dördüncü Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009;20-32.
186. Berek JS. Anatomi ve embriyoloji. In: Berek & Novak Jinekoloji. Ed. Erk A, Demirtürk F. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2017;62-111.
187. Mescher AL. Dişi üreme sistemi. In: Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas. Ed. Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS. Ondördüncü Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2019;460-89.
188. Eroschenko VP. Female reproductive system. In: diFiore'nin Histoloji Atlası. Ed. Demir R. Onikinci Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2016;505-57.
189. Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, 2008; 55-247.
190. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001; 121(5):647-53.
191. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. Manual of Bovine Embryo Transfer. JLTA, Shirakawa, Japan, 1995; 169-243.
192. Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos. Second Edition, London UK, CABI Publishing, 2003; 132-5.

- 193.Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 2013; 99(4):979-97.
- 194.Gruzinkas JG, Yovich JL. Gametes-The Oocytes. First published, New York USA, Cambridge Univ. Press, 1995; 1-441.
195. Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Molecular Human Reproduction* 2010; 16(10):715–25.
- 196.Khamsi F, Roberge S. Granulosa cells of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I. *Journal of Endocrinology* 2001; 170(3):565–73.
- 197.Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000; 25(3):279–83.
- 198.Şahin Y. ICSI uygulamalarında kümülüs hücre kültürü ve sonuçlarının değerlendirilmesi. T.C. Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2017.
- 199.Cihangir N. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu - embriyo transferi sikluslarında otolog kümülüs hücre - oosit kompleksinin kültür ortamı olarak kullanılmasının embriyo gelişim kalitesine, implantasyon ve gebelik oranlarına etkisinin araştırılması. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 2009.
- 200.Miao YL, Liu XY, Qiao TW, Miao DQ, Luo MJ, Tan JH. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2005; 73(5):1025-31.
- 201.Qiao TW, Liu N, Miao DQ, et al. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s). *Mol Reprod Dev.* 2008; 75(3):521-8.
- 202.Zhu J, Zhang J, Li H, et al. Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas ligand in mice. *Sci Rep.* 2015; 5:8683.
- 203.Mori T, Amano T, Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biol Reprod.* 2000; 62(4):913-9.
- 204.Dündar G. Kümülüs hücre kültüründe apoptosis ve luteinizasyon sürecinin IVF hastalarında embriyo gelişimi ve gebelik açısından değerlendirilmesi. Biruni

Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,  
Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı, İstanbul, 2019.

205. Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of cumulus cells and serum on in vitro maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod.* 1989; 40(4):720-8.
206. Guo N, Yang F, Liu Q, Ren X, et al. Effects of cumulus cell removal time during in vitro fertilization on embryo quality and pregnancy outcomes: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2016; 14:18.
207. Xue Y, Tong X, Jiang L, Zhu H, Yang L, Zhang S. Effect of cumulus cell removal 4 h post-insemination on fertilization and embryo quality: a prospective randomized sibling-oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(8):1049-53.
208. Van de Velde H, De Vos A, Joris H, Nagy ZP, Van Steirteghem AC. Effect of timing of oocyte denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13(11):3160-4.
209. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier L, Serkine AM. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod.* 2002; 17(2):362-9.
210. Ho JY, Chen MJ, Yi YC, Guu HF, Ho ES. The effect of preincubation period of oocytes on nuclear maturity, fertilization rate, embryo quality, and pregnancy outcome in IVF and ICSI. *J Assist Reprod Genet.* 2003; 20(9):358-64.
211. Álvarez C, García-Garrido C, Taronger R, González de Merlo G. In vitro maturation, fertilization, embryo development & clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Indian J Med Res.* 2013; 137(2):331-8.
212. Brackett BG. In vitro oocyte maturation and fertilization. *J Anim Sci.* 1985;61(3): 14-24.
213. Plachot M, Mandelbaum J. Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *Br Med Bull.* 1990,463 675-94.
214. Moor RM, Dai Y, Fulka Jr J. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum reprod Update.* 1998; 4(3):223-36.

- 215.Peker S. Capsaicin'in ovaryum granuloza hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozisi üzerine etkisi. T. C. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Bursa, 2015.
- 216.Morselli MG, Luvoni GC, Comizzoli P. The nuclear and developmental competence of cumulus-oocyte complexes is enhanced by three-dimensional coculture with conspecific denuded oocytes during in vitro maturation in the domestic cat model. *Reprod Domest Anim.* 2017; 2. 82-7.
- 217.Godard NM, Pukazhenti BS, Wildt DE, Comizzoli P. Paracrine factors from cumulus-enclosed oocytes ensure the successful maturation and fertilization in vitro of denuded oocytes in the cat model. *Fertil Steril.* 2009; 91(5):2051–60.
- 218.Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, de Kruif A. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology.* 2003; 60(1):135–49.
- 219.Tao Y, Cao C, Zhang M, Fang F, Liu Y, Zhang Y, Ding J, Zhang X. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2008; 92(4):438–47.
- 220.Wongsrikeao P, Kaneshige Y, Ooki R, Taniguchi M, Agung B, Nii M, Otoi T. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2005; 40(2):166–70.
- 221.Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci.* 2007; 85(13):E1–3.
- 222.Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999; 54:449-60.
- 223.Motta PM, Nottola SA, Pereda J, Croxatto HB, Familiari G. Ultrastructure of human cumulus ooforus: A transmission elektron microscopic study on oviductal oocytes and fertilized eggs. *Hum Reprod* 1995; 10(9):2361-7.
- 224.Yokoo M, Sato E. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int Rev Cytol.* 2004; 235:251-91.
- 225.Hampl A, Eppig JJ. Analysis of the mechanisms of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* 1995; 121(4):925-33.

226. Demir R. İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi. Ankara, Palme Yayıncılık, 1995:1-286.
227. Phillips DM, Dekel N. Maturation of the rat cumulus oocyte complex: structure and function. *Molecular Reprod and Development* 1991; 28(3):297-306.
228. Reichman DE, Politch J, Ginsburg ES, Racowsky C. Extended in vitro maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development, and reproductive outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27(7):347-56.
229. Shu Y, Gebhardt J, Watt J, Lyon J, Dasig D, Behr B. Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2007; 87(5):1022–7.
230. Cheng KW, Leung PC. The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Physiol Pharmacol.* 2000; 78(12):1029-52.
231. Metallinou C, Asimakopoulos B, Schroer A, Nikolettos N. Gonadotropin-releasing hormone in the ovary. *Reprod Sci.* 2007; 14(8):737–49.
232. Ruiz A, Remohi J, Minguez Y, Guanes PP, Simon C, Pellicer A. The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1997; 68(1):171–3.
233. Johnson LNC, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. Affiliations expand Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013; 100(3):704-11.
234. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M, Van Steirteghem A. Controlled comparison of conventional invitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14(9):2313-9.
235. Fishel S, Aslam I, Lisi F, Rinaldi L, et al. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod* 2000; 15(6):1278–83.

236. Khamsi F, Yavas Y, Roberge S, Wong JC, Lacanna IC, Endman M. Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2001; 75(2):342-7.
237. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Sattar MA, Amin YM. Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and borderline semen. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13:38–42.
238. Ramos L, De Boer P, Meuleman EJH, Braat DDM, Wetzels AMM. Evaluation of ICSI selected epididymal sperm samples of obstructive azoospermic males by the CKIA system. *J Androl* 2004; 25(3):406–11.
239. Yoeli R, Orvieto R, Ashkenazi J, Shelef M, Ben-Rafael Z, Bar-Hava I. Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25(1):23-8.
240. Zheng D, Zeng L, Lian Y, et al Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional in vitro fertilisation (IVF) in couples with non-severe male infertility (NSMI-ICSI): protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open*. 2019; 30(9):9.
241. Stimpfel M, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Conventional IVF improves blastocyst rate and quality compared to ICSI when used in patients with mild or moderate teratozoospermia. *Syst Biol Reprod Med* 2019; 65(6):458-64.
242. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Abbass AM. Fertilization and early embryology: co-culture of human pronucleate oocytes with their cumulus cells. *Hum Reprod* 1994; 9(9):1727-9.
243. Kim YJ, Ku SY, Kim YY, Liu HC, et al. MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles. *Hum Reprod* 2013; 28(11): 3050-61.
244. Carrell DT, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Udoff LC, Cornwell CE, Thorp C, Kuneck P, Erickson L, Campbell B. A simplified coculture system using homologous, attached cumulus tissue results in improved human embryo

- morphology and pregnancy rates during in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16(7):344-8.
- 245.Khamisi F, Roberge S, Lacanna IC, Wong J, Yavas Y. Effects of granulosa cells, cumulus cells, and oocyte density on in vitro fertilization in woman. *Endocrine* 1999; 10(2):161–6.
- 246.Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Human Reprod* 1998; 13(6):1638–44.
- 247.Aksoy T. ICSI ve IVF işlemi uygulanmış kardeş oositlerde embriyo gelişiminin dinamik embriyo görüntüleme sistemi ile morfokinetik özellikler yönünden karşılaştırılması. T. C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2015.
- 248.Kupka MS, D’Hooghe T, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, Castilla JA, Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Goossens V. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 2016; 31(2):233-48.
- 249.Gregory L. Ovarian markers of implantation potential in assisted reproduction. *Human Reproduction* 1998; 13(4):117-32.
- 250.Heffner L J. Advanced maternal age-how old is too old? *N Engl J Med.* 2004; 351(19):1927–9.
- 251.Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001; 2(4):280–91.
- 252.Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage stage embryos. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14(5):628–34.
- 253.Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril.* 2014; 101(3):656–63.

254. Capalbo A, Hoffmann ER, Cimadomo D, Maria Ubaldi F, Rienzi L. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Hum Reprod Update*. 2017; 23(6):706-22.
255. Munne S, Tomkin G, Cohen J. Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations. *Fertil Steril*. 2009; 91(3):943-5.
256. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod*. 2007; 22(7):1973–81.
257. Racowsky C, Ohno-Machado L, Kim J, Biggers JD. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? *Hum Reprod*. 2009; 24(9):2104–13.
258. Schoolcraft WB, Gardner DK. Blastocyst versus day 2 or 3 transfer. *Semin Reprod Med*. 2001; 19(3): 259-68.
259. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Serkine AM, Tesquier L. Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer. *Hum Reprod*. 2000; 15(6):24-30.
260. Glujovsky D, Farquhar C. Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms? *Fertil Steril*. 2016; 106(2):244– 50.
261. Gardner DK. Blastocyst culture: toward single embryo transfers. *Hum Fertil (Camb)*. 2000; 3(4):229–37.
262. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000; 15(6):9-23.
263. Farshi M, Gholam S, Jorsarai GA, Esmaelzadeh S, Golalipour MJ. In vitro Maturation of Germinal Vesicle Oocytes in Stimulated Intracytoplasmic Sperm Injection. *Cell Journal* 2011; 13(2):73-8.
264. Mikkelsen AL, E. Host E, Lindenberg S. Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. *Reproduction* 2001; 122(3):481-6.

265. Jacobs AL, Carson DD. Uterine epithelial secretion of interleukine-1 alfa induces prostaglandine E2 (PGE2) and PGF 2 alfa secretion by uterine stromal cells in vitro. *Endocrinology* 1993; 132(1):300-8.
266. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S, et al. Improved pregnancy rate after transfer of human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992; 58(3):569-74.
267. Bongso A, Soon-Cye, N Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam S, et al. Improved quality of human embryos when cocultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989; 4(6):706-13.
268. Chian RC, Lim JH, Tan SL. State of the art in in-vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16(3):211-9.
269. Jayot S, Parnex I, Verdaguer S, et al. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantations. *Fertil Steril* 1995; 63:109-14.
270. Quinn P, Margalit R. Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocysts formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 1996; 13(1):9-14.
271. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: A paternal influence? *Hum Reprod.* 1998 ;13(6):1632-7.
272. Miller JE, Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod.* 2001; 16(5):918-24.
273. Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod.* 2000; 15(7):1592-6.
274. de Moura BRL, Gurgel MCA, Machado SPP, et al. Low concentration of hyaluronidase for oocyte denudation can improve fertilization rates and embryo quality. *JBRA Assist Reprod* 2017; 21(1):27-30.
275. Doubilet PM, Benson CB. *Obstetrik ve Jinekolojide Ultrasonografi Atlası*. Çev Ed. Ermiş H, Kaleli S. İkinci Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevi, 2015;3-14.

- 276.School D. Obstetrik ve jinekolojik ultrasonda tıbbi ve yasal konular. In: Ultrason Obstetrik ve Jinekoloji. Çev Ed. Şen C. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2015; 56-60.
277. <https://www.bulenttiras.com/tup-bebek-basari-orani-hesaplama> adresinden 23.08.2021 tarihinde erişilmiştir.
- 278.Ateş BA, Toraman A, Karatopuk D. Üniversite hastanesindeki tüp bebek ünitesinin maliyet analizi. *DeğiPark Pamukkale Üniv Sosyal Bilim Enstitüsü Dergisi* 2018; 31:87-98.
- 279.Baykal, B. Üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) uygulamalarında maliyet analizi. Hacettepe Üniversitesi. Sağlık Bilimler Enstitüsü, Yayınlanmamış Yüksek Lisans tezi; 2010: 99.
- 280.Çavuşoğlu EE. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulanan infertil vakaların tam zamanlı izleme sisteminde (time lapse) multinükleuslu blastomer içeren embriyolarının blastokist aşamasına ulaşma oranlarının retrospektif olarak incelenmesi. İstanbul T.C. Maltepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, İstanbul 2018.
- 281.Naji O, Moska N, Dajani Y, El-Shirif A, et al. Early oocyte denudation does not compromise ICSI cycle outcome: a large retrospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 2018; 37(1):18-24.
- 282.Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 2003; 9(1):35-48.
- 283.Scarica C, Cimadomo D, Dovere L, Giancani A, et al. An integrated investigation of oocyte developmental competence: expression of key genes in human cumulus cells, morphokinetics of early divisions, blastulation, and euploidy. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36(5):875-87.
- 284.Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383(6600):531-5.
- 285.Taheri F, Mehrizi AA, Khalili MA, Halvaei I. The influence of ovarian hyperstimulation drugs on morphometry and morphology of human oocytes in

- ICSI program. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2018; 57(2): 205-10.
286. Bassil R, Casper RF, Meriano J, Smith R, Haas J, et al. The influence of ovarian hyperstimulation drugs on morphometry and morphology of human oocytes in ICSI program- Can Oocyte Diameter Predict Embryo Quality? *Reproductive Sciences* 2021; 28:904-8.
287. Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, et al. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod* 2006; 3:2.
288. Hassan HA. Cumulus cell contribution to cytoplasmic maturation and oocyte developmental competence in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 2001; 18(10):539-43.
289. Cındık M, Sezen ŞC, Özsoy HM, Küçük T, Korkmaz C. Kümüls hücrelerinin oosit in-vitro matürasyonu üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 21(3):161-5.
290. Zhang A, Xu B, Sun Y, Lu X, Niu Z, Chen Q, Feng Y, Xu C. The effect of human cumulus cells on the maturation and developmental potential of immature oocytes in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(4):313–9.
291. Speyer B, O'Neill H, Saab W, Seshadri S, et al. In assisted reproduction by IVF or ICSI, the rate at which embryos develop to the blastocyst stage is influenced by the fertilization method used: a split IVF/ICSI study. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36(4): 647–54.
292. Hu X, Liu Y, Zhang X, Lee P, et al. Oocyte Degeneration After ICSI Is Not an Indicator of Live Birth in Young Women. *Front. Endocrinol* 2021; 12.
293. Liu L, Cai J, Li P, Jiang X, Ren J. Clinical outcome of cycles with oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2017; 63(2):113-9.
294. Rosen MP, Shen S, Dobson TA, Fujimoto VY, McCulloch CE, et al. Oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection: a multivariate analysis to assess its importance as a laboratory or clinical marker. *Fertil Steril* 2006; 85(6):1736-43.

295. Benkhalifa M, Demirel A, Sari T, Balashova E, Tsouroupani M, Giakoumakis Y, Gurgan T. Autologous embryo-cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized study. *Zygote* 2012;20(2):173-80.
296. Parikh FR, Nadkarni SG, Naik NJ, Naik DJ, Uttamchandani SA. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86(4):839-47.

## EKLER

### Ekler 1: Etik Kurul



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/622

09.10.2020

**Rayın Dr. Öğretim Üyesi Aysin Pınar Türkmen**

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu uygulanan hastalarda oosit denudasyonunun fertilizasyon ve embriyo kalitesi üzerine prognostik değeri başlıklı OMÜ KAİK 2020/ 588 Karar nolu Dosya taraması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 08.10.2020 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Rams ÇOLAK  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

## Ekler 2: İntihal Oranı

18.01.2022 15:04

Turnitin

### Turnitin Orijinallik Raporu

İçleme kodu: 18-Oca-2022 14:52 +03  
NUMARA: 1743470251  
Kelime Sayısı: 34530  
Gönderildi: 1

Benzerlik Endeksi  
**%5**

**Kaynağa göre Benzerlik**  
Internet Sources: %5  
Yayımlar: %2  
Öğrenci Ödevleri: %1

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU  
UYGULANAN HASTALARDA OOSİT  
DENUDASYONUNUN FERTİLİZASYON VE  
EMBRİYO KALİTESİ ÜZERİNE PROGNOSTİK  
DEĞERİ** Berrin Yangın Doğru tarafından

[Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi on 2020-12-28](#)

< 1% match (28-Ara-2020 tarihli öğrenci ödevleri)

< 1% match (22-Şub-2021 tarihli öğrenci ödevleri)

[Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi on 2021-02-22](#)

< 1% match (17-Eyl-2021 tarihli öğrenci ödevleri)

[Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi on 2021-09-17](#)

< 1% match (01-Oca-2022 tarihli öğrenci ödevleri)

[Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi on 2022-01-01](#)

< 1% match (03-Haz-2020 tarihli internet)

[https://www.journalagent.com/yeditepe/pdfs/YD1\\_15\\_2\\_145\\_269.pdf](https://www.journalagent.com/yeditepe/pdfs/YD1_15_2_145_269.pdf)

< 1% match (18-May-2015 tarihli internet)

[http://www.journalagent.com/jpr/pdfs/JPR\\_1\\_1\\_13\\_21.pdf](http://www.journalagent.com/jpr/pdfs/JPR_1_1_13_21.pdf)

< 1% match (12-Oca-2022 tarihli internet)

[https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/431383/yokAcikBilim\\_10332860.pdf?isAllowed=v&sequence=-1](https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/431383/yokAcikBilim_10332860.pdf?isAllowed=v&sequence=-1)

< 1% match (12-Oca-2022 tarihli internet)

[https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/432646/yokAcikBilim\\_10049087.pdf?isAllowed=v&sequence=-1](https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/432646/yokAcikBilim_10049087.pdf?isAllowed=v&sequence=-1)

< 1% match (10-Oca-2022 tarihli internet)

[https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/164775/yokAcikBilim\\_10217764.pdf?isAllowed=v&sequence=-1](https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/164775/yokAcikBilim_10217764.pdf?isAllowed=v&sequence=-1)

< 1% match (12-Oca-2022 tarihli internet)

[https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/438767/yokAcikBilim\\_402841.pdf?isAllowed=v&sequence=-1](https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/438767/yokAcikBilim_402841.pdf?isAllowed=v&sequence=-1)

< 1% match (11-Oca-2022 tarihli internet)

[https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/353132/yokAcikBilim\\_367079.pdf?isAllowed=v&sequence=-1](https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/353132/yokAcikBilim_367079.pdf?isAllowed=v&sequence=-1)

< 1% match (12-Oca-2022 tarihli internet)

[https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/439141/yokAcikBilim\\_10004623.pdf?isAllowed=v&sequence=-1](https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/439141/yokAcikBilim_10004623.pdf?isAllowed=v&sequence=-1)

< 1% match (20-Şub-2021 tarihli internet)

<http://www.andrologi.org.tr/andrologi/DATA/tadyavinlari/Erkek-Ureme-Sistemi-Hastaliklari-ve-Tedavisi.pdf>

< 1% match (17-Eyl-2013 tarihli internet)

[http://istanbulisaglik.gov.tr/w/tez/pdf/kadin\\_hast/dr\\_ali\\_instein\\_gonenc.pdf](http://istanbulisaglik.gov.tr/w/tez/pdf/kadin_hast/dr_ali_instein_gonenc.pdf)

< 1% match (17-Eyl-2013 tarihli internet)

[http://istanbulisaglik.gov.tr/w/tez/pdf/kardiyoloji/dr\\_deniz\\_demirci.pdf](http://istanbulisaglik.gov.tr/w/tez/pdf/kardiyoloji/dr_deniz_demirci.pdf)

< 1% match (06-Kas-2020 tarihli internet)

<http://openaccess.maltepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12415/6674/10364961.pdf?isAllowed=v&sequence=1>

< 1% match (29-Eki-2021 tarihli internet)

<http://openaccess.maltepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12415/8273/10427991.pdf?isAllowed=v&sequence=1>

< 1% match (17-Eyl-2020 tarihli internet)

<http://openaccess.maltepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12415/3783/484866.pdf?isAllowed=v&sequence=1>

< 1% match (09-Tem-2020 tarihli internet)

<http://openaccess.maltepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12415/4895/%c4%b0nfertilite....pdf?isAllowed=v&sequence=1>

< 1% match (25-Eyl-2020 tarihli internet)

<http://openaccess.maltepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12415/265/10208816.pdf?isAllowed=v&sequence=1>

< 1% match (29-Eyl-2021 tarihli internet)

<http://openaccess.maltepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12415/7342/10376682-.pdf>

< 1% match (07-May-2019 tarihli internet)

<http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr/8080/xmlui/bitstream/handle/11655/917/19247173-Of9e-47ba-b17f-c27f97b-9466.pdf?isAllowed=v&sequence=1>

< 1% match (18-Ara-2020 tarihli internet)

<http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/48817.pdf>

< 1% match (16-Haz-2021 tarihli internet)

<http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/61200.pdf>

< 1% match (22-Haz-2021 tarihli internet)

[https://www.turnitin.com/newreport\\_printview.asp?eq=0&eb=1&eam=0&oid=1743470251&cid=0&en=0&m=2&svr=27&r=92.76026467333432&lang=tr](https://www.turnitin.com/newreport_printview.asp?eq=0&eb=1&eam=0&oid=1743470251&cid=0&en=0&m=2&svr=27&r=92.76026467333432&lang=tr)

1/29